

**Untersuchungen über die Wirksamkeit von
Immunstimulantien aus Mikroorganismen
und von Tierpockenpräparaten gegen
Tumoren *in vitro* und *in vivo***

Ernst Marsig

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Umwelthygiene und Impfwesen
Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der
Technischen Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. H. Stickl

vorgelegt über das

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKSAMKEIT VON
IMMUNSTIMULANTIEN AUS MIKROORGANISMEN UND VON
TIERPOCKENPRÄPARATEN GEGEN TUMOREN *IN VITRO* UND *IN VIVO*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

von

Ernst Marsig
aus München

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

1. Einleitung	100
2. Hauptteil	101
3. Zusammenfassung	102
4. Literaturverzeichnis	103
5. Anhang	104
6. Schlusswort	105

Meinen Eltern

1. Einleitung	106
2. Hauptteil	107
3. Zusammenfassung	108
4. Literaturverzeichnis	109
5. Anhang	110
6. Schlusswort	111
7. Bibliographie	112
8. Literaturverzeichnis	113
9. Anhang	114
10. Schlusswort	115
11. Bibliographie	116
12. Literaturverzeichnis	117
13. Anhang	118
14. Schlusswort	119
15. Bibliographie	120
16. Literaturverzeichnis	121
17. Anhang	122
18. Schlusswort	123
19. Bibliographie	124
20. Literaturverzeichnis	125
21. Anhang	126
22. Schlusswort	127
23. Bibliographie	128
24. Literaturverzeichnis	129
25. Anhang	130
26. Schlusswort	131
27. Bibliographie	132
28. Literaturverzeichnis	133
29. Anhang	134
30. Schlusswort	135
31. Bibliographie	136
32. Literaturverzeichnis	137
33. Anhang	138
34. Schlusswort	139
35. Bibliographie	140
36. Literaturverzeichnis	141
37. Anhang	142
38. Schlusswort	143
39. Bibliographie	144
40. Literaturverzeichnis	145
41. Anhang	146
42. Schlusswort	147
43. Bibliographie	148
44. Literaturverzeichnis	149
45. Anhang	150
46. Schlusswort	151
47. Bibliographie	152
48. Literaturverzeichnis	153
49. Anhang	154
50. Schlusswort	155
51. Bibliographie	156
52. Literaturverzeichnis	157
53. Anhang	158
54. Schlusswort	159
55. Bibliographie	160
56. Literaturverzeichnis	161
57. Anhang	162
58. Schlusswort	163
59. Bibliographie	164
60. Literaturverzeichnis	165
61. Anhang	166
62. Schlusswort	167
63. Bibliographie	168
64. Literaturverzeichnis	169
65. Anhang	170
66. Schlusswort	171
67. Bibliographie	172
68. Literaturverzeichnis	173
69. Anhang	174
70. Schlusswort	175
71. Bibliographie	176
72. Literaturverzeichnis	177
73. Anhang	178
74. Schlusswort	179
75. Bibliographie	180
76. Literaturverzeichnis	181
77. Anhang	182
78. Schlusswort	183
79. Bibliographie	184
80. Literaturverzeichnis	185
81. Anhang	186
82. Schlusswort	187
83. Bibliographie	188
84. Literaturverzeichnis	189
85. Anhang	190
86. Schlusswort	191
87. Bibliographie	192
88. Literaturverzeichnis	193
89. Anhang	194
90. Schlusswort	195
91. Bibliographie	196
92. Literaturverzeichnis	197
93. Anhang	198
94. Schlusswort	199
95. Bibliographie	200
96. Literaturverzeichnis	201
97. Anhang	202
98. Schlusswort	203
99. Bibliographie	204
100. Literaturverzeichnis	205

INHALT

Seite

1. Einleitung.....	9
2. Schrifttum.....	11
2.1 Körpereigene Abwehr gegen Tumoren.....	11
2.1.1 Zellen der Abwehr	11
2.1.2 Tumor Nekrose Faktor und andere Zytokine	16
2.2 Substanzen zur Steigerung der Abwehr gegen Tumoren	24
2.3 Tumormodelle	26
3. Eigene Untersuchungen.....	29
3.1 Material und Methoden	29
3.1.1 Tiermaterial	29
3.1.2 Permanente Zelllinien.....	30
3.1.3 Zellzählung.....	31
3.1.4 Substanzen zur <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Behandlung	31
3.1.4.1 Kontrollen	31
3.1.4.2 Paramunitätsinducer PIND-AVI.....	31
3.1.4.3 Paramunitätsinducer PIND-ORF.....	32
3.1.4.4 New Castle Disease-Virus (ND).....	32
3.1.4.5 Corynebacterium parvum (Cp)	33
3.1.4.6 Bacillus Calmette-Guérin (BCG)	33
3.1.4.7 Lipopolysaccharid (LPS).....	33
3.1.4.8 Polyinosinylat-polycytidylat (Poly I:C)	33
3.1.4.9 Ochratoxin A.....	34
3.1.4.10 HT-2 Toxin.....	35
3.1.4.11 Omnadin [®]	36
3.1.4.12 Tumor Nekrose Faktor (TNF)	36

3.1.5 Gewinnung der Seren von Versuchstieren	37
3.1.6 Gewinnung und Kultivierung von adhäsiven murinen Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM).....	37
3.1.7 <i>In vitro</i> Versuche	41
3.1.7.1 L929-Zytotoxizitäts-Test	41
3.1.7.2 Versuche mit dem Friend Erythroleukämie Zellklon F4-1.....	45
3.1.8 <i>In vivo</i> Versuche	47
3.1.8.1 Ehrlich Aszites Karzinom	47
3.1.8.2 Friend Erythroleukämie Zellklon F4-1	50
3.1.8.3 Versuch mit Methylcholanthren	51
3.2 Ergebnisse	53
3.2.1 <i>In vitro</i> Versuche	53
3.2.1.1 Versuche im L929-Zytotoxizitäts-Test.....	53
3.2.1.2 Wirkungen auf Friend Erythroleukämie	
Zellklon F4-1.....	70
3.2.2 <i>In vivo</i> Versuche	80
3.2.2.1 Versuche mit Ehrlich Aszites Karzinom.....	80
3.2.2.2 Versuche mit Friend Erythroleukämie	88
3.2.2.3 Versuch mit Methylcholanthren	91
4. Besprechung der Ergebnisse	97
5. Zusammenfassung /Summary	107
6. Literaturverzeichnis	111
7. Abkürzungen	132
Lebenslauf	134

1. Einleitung

Die Entstehung von Krebszellen ist ein sehr häufiges Ereignis. Es gibt Schätzungen, daß täglich 20-40 Krebszellen in jedem Menschen entstehen. Physikalische (Strahlung), chemische und biologische (Viren) Umweltfaktoren üben ihren schädigenden Einfluß auf die Gene des Zellkerns aus. Dies kann zur Veränderung der Morphologie und des Verhaltens der Zelle führen. Sie wächst (Proliferation) und reift (Differenzierung) nicht mehr wie genetisch vorgesehen. Doch werden derart veränderte Zellen meist vom Organismus erkannt und in wenigen Minuten unschädlich gemacht. Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß die körpereigene Abwehr hervorragend auf Krebszellen reagiert. Es gilt eher als ein Ausnahmefall, wenn es dennoch zur Vermehrung entarteter Zellen kommt.

Die Therapie von Tumoren durch Chirurgie, mit Zytostatika, mit Bestrahlung und mit anderen physikalischen Maßnahmen hat in der Vergangenheit gezeigt, daß es trotz vieler Erfolge immer auch Rückschläge gab. Multiple Metastasen und Leukämien sind inoperabel, Bestrahlung und Zytostatika haben erhebliche Nebenwirkungen (u.a. Immunsuppression), die eine Weiterführung der Therapie oft in Frage stellen.

Geeignete Immunstimulantien und Zytokine (Mediatoren, z.B. Interferon, Tumor Nekrose Faktor u.a.) entfalten ihren Anti-Tumor-Effekt direkt oder über Mechanismen der körpereigenen Abwehr. Sie bieten sich deshalb zur Therapie von Tumoren an. Auch die Interferontherapie hat heute eine gute Indikation bei bestimmten Leukämien (Pfreundschuh, 1986; Lange u. Masihi, 1987).

Die vorliegenden Untersuchungen hatten zum Ziel, verschiedene bakterielle und virale Immunstimulantien, die bei anderen Untersuchungen antitumorale Wirkungen gezeigt haben in einem einheitlichen Testsystem *in vitro* und *in vivo* zu vergleichen. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei löslichen Mediatoren - Zytokinen - geschenkt, deren große Bedeutung bei der unspezifischen Abwehr von Tumoren erst in jüngster Zeit erkannt wurde. Um die Wirkungen möglichst vielseitig zu untersuchen wurden Experimente mit zwei verschiedenen *in vitro* Tests und mit drei *in vivo* Tumormodellen durchgeführt.

2. Schrifttum

2.1 KÖRPEREIGENE ABWEHR GEGEN TUMOREN

2.1.1 Zellen der Abwehr

Die Zellen des Immunsystems - Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten - sind alle wesentlich bei der Tumorabwehr. Sie interagieren entweder durch direkten Zellkontakt mit dem Tumor oder sie setzen Zytokine frei (siehe *Tabelle 1* und *Abbildung 1*)

Makrophagen:

Die zentrale Rolle bei der Tumorabwehr spielt der aktivierte Makrophage, indem er das Tumorentigen erkennt, am MHC II den CD4⁺ tragenden T-Lymphozyten präsentiert (Bach und Sachs, 1987) und Komplementfaktoren produziert (Bentley et al., 1981). Er ist in der Lage Tumorzellen direkt mit reaktiven Sauerstoff-Verbindungen wie O[•] Radikale und H₂O₂ (Nakagawara et al., 1982; Nathan et al., 1983), durch Lysozym (Hibbs, 1974) oder durch andere Enzyme (Currie, 1978; Adams et al., 1980) abzutöten. Wie andere Körperzellen setzt er Entzündungsmediatoren aus der Arachidonsäure - Prostaglandine, Leukotriene und Prostacycline - frei (Kunkel et al., 1986). Er produziert wichtige Zytokine, wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) (Beutler und Cerami, 1986; Old, 1985), Interferon (IFN) (Njeuman, 1982) und Interleukin 1 (IL-1) (March et al., 1985).

T-Lymphozyten:

Ebenso sind die T-Lymphozyten von zentraler Bedeutung. Sie differenzieren sich von Progenitoren zu reifen T-Lymphozyten indem sie auf einen Stimulus, meist Interleukin 1 (IL-1) oder dann Interleukin 2 (IL-2), auf ihrer Zellmembran Moleküle exprimieren, die die Zellen eindeutig bestimmten Populationen zuordnen lassen (Fitch, 1986). Durch direkten Zellkontakt mit dem, am MHC II der Makrophagen präsentierten, Tumor-



antigen werden die CD4⁺ Zellen (oft synonym als T₄ oder T Helfer Zellen bezeichnet) stimuliert, IL-2 und IL-4 freizusetzen (Wagner, 1988). Die CD8⁺ Lymphozyten (T₈ oder T Suppressor und zytotoxische T-Lymphozyten) können auch direkt mit dem Tumorzellantigen mittels MHC I der Tumorzelle Kontakt aufnehmen. Diese beiden Populationen und eine dritte, die Natural Killer Zellen (NK), tragen alle einen erst kürzlich entdeckten 103 kD Rezeptor, der auch als Auslöser (trigger) zum Abtöten von benachbarten oder gebundenen Zellen dient (Fleischer, 1986a; Fleischer et al., 1986b; 1987). Weiter wurden andere aus der T-Lymphozytenreihe stammende Zellen beschrieben, die sich durch ihre Membranzmoleküle oder durch ihre Wirkung an unterschiedlichen Zielzellen unterscheiden:

Lymphokin aktivierte Killerzellen (LAK) (Rosenberg, 1985),
 Natural Cytotoxic Cells (NC) und
 Natural Cytotoxic T Cells (NCTC) (Gautam et al., 1986).

Darüber wie die Zielzellen abgetötet werden, besteht noch keine eindeutige Auffassung: Es werden lösliche "Perforine", oder Zytolysine diskutiert, die unidirektional von Zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) abgegeben werden. Dabei kann es zum Abtöten von unbeteiligten, nicht gebundenen Zellen kommen (Fleischer, 1986a; Podack, 1987). Oder die Zielzelle hat eine genetische Empfänglichkeit für von CTL abgegebene Substanzen, die zum Suizid der Zelle führen (Ucker, 1987).

Tabelle 1:

Zusammenstellung wichtiger zellulärer und humoraler, direkt an der Tumorbabwehr beteiligter Faktoren:

Zuordnung: Wirkungsweise Faktor		Literatur
<u>humorale Faktoren:</u>		
als Vermittler:		
Zell zu Zellkontakt	-Komplement -Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)	Bitter-Suermann, 1983 Bach, 1987
Enzyme: Lysis und Abbau	-Lysosomale Enzyme -Arginase -neutrale Protease	Hibbs, 1974 Currie, 1978 Kozars, 1980
Reaktive O-Verbindungen:	-H ₂ O ₂ -O*, OH* Radikale	Nathan, 1983 Nathan, 1979 Cross, 1985
Zytokine: Zytotoxisch/zytostatisch nur auf Zielzelle vielfach, Immunmodulation	-Interferone (IFN) -Tumor Nekrose Faktor (TNF) -Interleukin-1 (IL-1) -Natural Killer Cytotoxic Factor (NKCF) -Lymphotoxin (LT) -Leukoregulin (LRG)	Gresser, 1985 Old, 1985 Beutler, 1986 Onozeki, 1985 Wright, 1982 Ortaldo, 1986a Ortaldo, 1986b Ransom, 1985
<u>Zelluläre Faktoren:</u>		
Leukozyten:		
Freisetzung von Faktoren oder Phagozytose	-Granulozyten -Makrophagen	Nathan, 1979 Möhnel, 1980 Fogler, 1985
Lymphozyten:		
spezifischer Zellkontakt oder Freisetzung von Faktoren	-T-Lymphozyten (CTL) -Lymphokin aktivierte Killerzellen (LAK) -Natural Killer Zellen (NK) -Natural Cytotoxic T-Cells (NCTC) -Natural Cytotoxic Cells (NC)	Fleischer, 1987 Rosenberg, 1985 Janiek, 1984 Degliantoni, 1985 Gautam, 1986

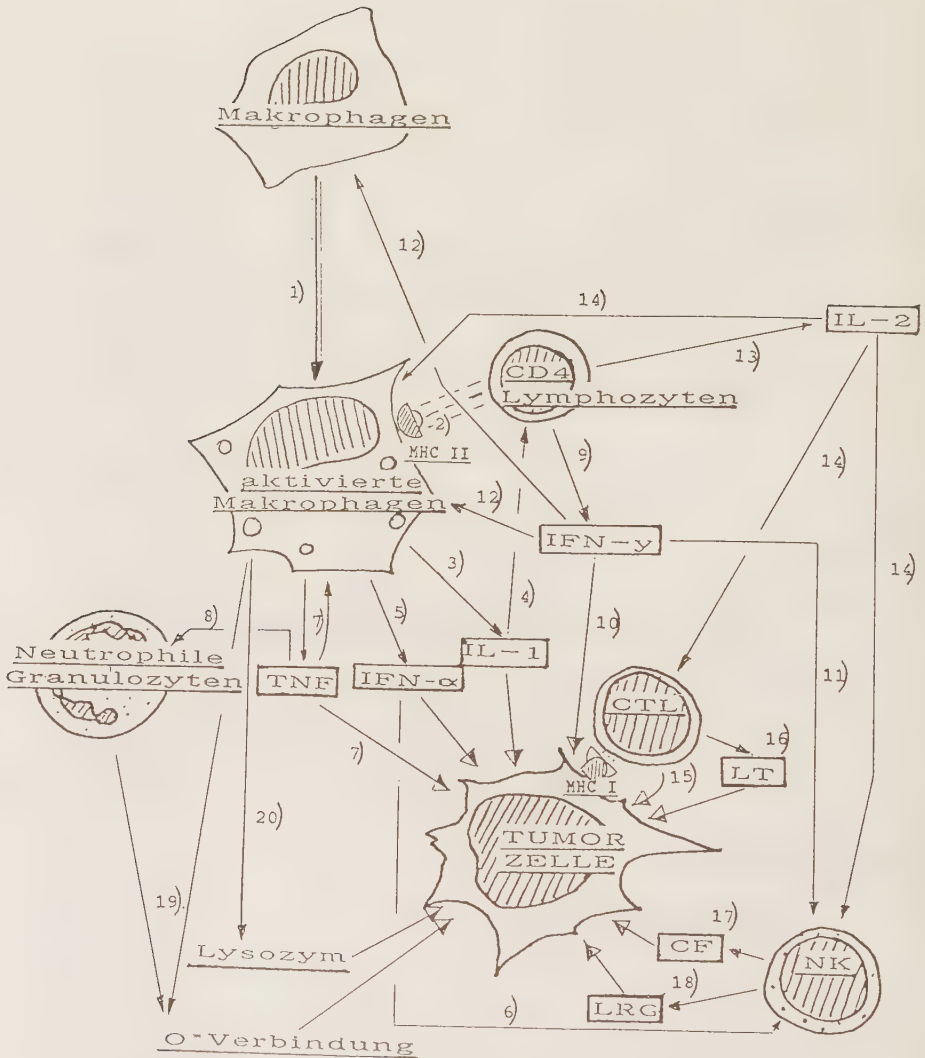


Abbildung 1:
Wechselwirkungen zwischen Tumorzelle und Zellen des
Immunsystems (schematisiert)

Erläuterungen zur Abbildung 1:

- | | | |
|-----|---|---|
| 1) | Makrophagen werden durch Antigenkontakt aktiviert | (Bach, 1987) |
| 2) | Präsentation des Antigens am MHC II für CD4 Lymphozyten | (Bach, 1987) |
| 3) | IL-1 Produktion von Makrophagen | (Kaufmann, 1987) |
| | IL-1 ist zytotoxisch auf Tumoren | (Martin, 1987; Onozaki, 1985) |
| 4) | IL-1 stimuliert CD4 | (Dinareello, 1987) |
| 5) | IFN- γ Produktion von Makrophagen $\rightarrow$ direkt zytotoxisch | (Kirchner, 1984) |
| 6) | IFN- γ fördert Differenzierung von T-Lymphozyten | (Rossi, 1985) |
| 7) | TNF Produktion von Makrophagen mit Selbststimulation | (Matthews, 1978; Old, 1987) |
| | TNF stimuliert MHC I Präsentation in Tumorzellen | (Pfizenmaier, 1987) |
| 8) | TNF stimuliert Granulozyten zur Phagozytose | (Shalaby, 1985) |
| 9) | IFN- γ Produktion von T-Lymphozyten | (Kirchner, 1984) |
| 10) | IFN- γ wirkt direkt zytotoxisch | (Kirchner, 1984) |
| 11) | IFN- γ stimuliert NK | (Gidlund, 1978; Rivière, 1983) |
| 12) | IFN- γ stimuliert Makrophagen zur TNF Produktion,
erhöht MHC II Expression, | (Gifford, 1987)
(Pujol Borell, 1987) |
| 13) | IL-2 Produktion von CD4 Lymphozyten | (Kaufmann, 1987) |
| 14) | IL-2 stimuliert Lymphozyten und Makrophagen zur
Differenzierung und zur Freisetzung von Zytokinen | (Nedwin, 1985) |
| | Bildung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen | (Rosenberg, 1985) |
| 15) | von CTL werden nach Antigenkontakt auf MHC I
Perforine und andere zytotoxische Moleküle freigesetzt | (Fleischer, 1986b; Podack, 1987) |
| 16) | LT Produktion von CTL | (Onozaki, 1984; Pennica, 1984) |
| 17) | CF Produktion von NK | (Degliantoni, 1984; Wricht, 1982) |
| 18) | LRG Produktion von NK | (Ransom, 1985) |
| 19) | Produktion von reaktiven O-Verbindungen von Makrophagen
und von Granulozyten (auch durch TNF stimulierbar) | (Nathan, 1983)
(Kapp, 1987) |
| 20) | Lysozym und andere Proteine von Makrophagen | (Hibbs, 1974) |

Legende:



zytotoxische Wirkung
stimulierende Wirkung
Zytokin

2.1.2 Tumor Nekrose Faktor und andere Zytokine

Zytokine sind Botenstoffe, die der Kommunikation zwischen Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und zahlreichen anderen Körperzellen dienen. Die Zytokine werden erst als Antwort auf einen Reiz (Aktivierung der Zelle) gebildet. Sie werden nicht, wie etwa Entzündungsmediatoren, präformiert in Vesikeln der Zellen gespeichert (Kaufmann, 1987). Durch molekularbiologische Techniken ist man heute in der Lage viele Zytokine eindeutig zu charakterisieren und kloniert in Reinstform darzustellen, wodurch die Nomenklatur nicht mehr ausschließlich operationellen Gesichtspunkten folgen muß (Kaufmann, 1987). Direkt gegen Tumoren wirksame Zytokine sind die seit langem geforderten Zytotoxischen Faktoren (Cytotoxic Factor, CF), wobei gerade hier noch nicht endgültig geklärt ist, wieviele CF es von Natural Killer Zellen (NK) und verwandten Zellen gibt. CF von Monozyten ist biologisch und biochemisch identisch zu Tumor Nekrose Faktor (TNF) (Nissen-Meyer et al., 1987) und die Aktivität von murinen NK Zellen wird zum Teil durch TNF vermittelt (Ortaldo et al., 1986b). Interferone (IFN) und Interleukine (IL), als zentrale Mediatoren zwischen Immunsystem und anderen Zellen, sind auch direkt antitumoral wirksam. Lymphotoxin (LT) und Tumor Nekrose Faktor (TNF) sind nicht ausschließlich antitumoral wirksam, sondern werden sogar mit metabolischen Hormonen in Zusammenhang gebracht (Beutler und Cerami, 1987). Ein jüngst beschriebenes Zytokin, Leukoregulin (LRG) (Ransom et al., 1985) ist ebenfalls antitumoral wirksam und ließ sich von CF abgrenzen. Daneben können Zytokine, wie TNF, IFN und Differenzierung induzierende Faktoren (DIF), maligne hämatopoetische Zellen phänotypisch verändern und somit ihr Proliferations- und Differenzierungsverhalten dem Verhalten normaler Zellen angleichen (Moore et al., 1983; Takeda et al., 1986; Rossi, 1985).

Die wesentlichen Eigenschaften der Zytokine mit direkter Wirkung auf Tumoren sind in *Tabelle 2* mit weiterführenden Literaturangaben zusammengefaßt, *Abbildung 1* gibt schematisiert einen Überblick über die Wechselwirkungen zwischen Tumorzelle und Zellen des Immunsystems. Hier soll nur auf TNF näher eingegangen werden.

Tumor Nekrose Faktor (TNF):

Molekül und Nachweis:

Der TNF, erstmals 1975 von Carswell beschrieben, ist ein Protein aus ca. 157 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 17-18 kD. Natürlicher TNF kommt meist als Dimer oder Polymer vor. Er wird von Makrophagen (Männel et al., 1980a), T- und B-Lymphozyten (Nedwin et al., 1985; Williamson et al., 1983) sowie Mastzellen (Steffen et al., 1987) gebildet. LT besitzt 30-50% Aminosäurehomologie zu TNF und wird am gleichen Chromosom der Maus genetisch kodiert, weshalb vorgeschlagen wurde, LT als TNF- β zu bezeichnen (Aggarwal et al., 1985; Pennica et al., 1984). Die TNF Produktion wird stimuliert durch LPS oder Lipid A (Ha et al., 1985) am besten nach Aktivierung des Mononukleären Phagozytose Systems (MPS) mit *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), *Corynebacterium parvum* (Cp; synonym *Propionibacterium acnes*) und anderen bakteriellen Immunstimulantien (Haranaka et al., 1984). Aber auch Viren (Aderka et al., 1986), TNF, IFN und IL-2 (Old, 1987; Nedwin et al., 1985) stimulieren die endogene TNF Produktion. Der Nachweis der Wirkung von TNF erfolgt *in vivo* gegen durch Methylcholanthren induzierte Tumoren (MCA) der Maus, wodurch der Tumor hämorrhagisch nekrotisiert wird (Carswell et al., 1975) oder *in vitro* im L929-Zytotoxizitäts-Test mit Zusatz von Aktinomycin D (Flick und Gifford, 1984). Seit 1987 wird auch die ELISA Technik eingesetzt (Hirai et al., 1987).

Antitumorale Wirkung:

TNF wirkt gegen einige Tumorzelllinien zytotoxisch, gegen andere zytostatisch, doch viele weitere Tumorzelllinien bleiben unbeeinflusst. Dies wurde von einigen Untersuchern immer wieder festgestellt. Das Wachstum diploider, nicht transformierter Zelllinien wird durch TNF nicht gehemmt (Helson et al., 1975; Haranaka und Satomi, 1981; Old, 1985). Für Fibroblasten ist TNF sogar ein Wachstumsfaktor (Sugarman et al., 1985; Vilcek et al., 1986). Die unterschiedliche Wirksamkeit gegenüber Tumorzelllinien wurde mit der Anzahl Rezeptoren pro Zielzelle in Zusammenhang gebracht, doch ist diese These nicht haltbar, da TNF-resistente Zellen auch Rezeptoren für TNF haben (Tsujiimoto et al., 1985).

Die TNF Wirksamkeit ist vom Mitosezyklus abhängig. In der G₂ Phase wird der Zyklus gestoppt und es erfolgt die Lysis der Tumorzelle. Vinblastin und Colcemid unterstützen diese Wirkung (Darzynkiewicz et al., 1984).

Neben der direkten Wirkung von TNF auf Tumoren wird deutlich, daß auch das umliegende Gewebe für die hämorrhagische Nekrose des Tumors *in vivo* verantwortlich ist. Das Kapillarendothel wird z.B. so geschädigt, daß es zur Koagulation kommt (Nawroth et al., 1986; Proietti et al., 1987; Sato und Goto, 1987). TNF führt zur Abdichtung der gap junctions zwischen den Tumorzellen und isoliert somit die Zelle, was zum Zelltod führt (Ware et al., 1987). TNF fördert die Proteasenfreesetzung, die selbst oder durch Phospholipasenaktivierung zur Zytolyse führt (Beyaert et al., 1987). Sauerstoffradikale (O^{*}) aus dem Arachidonsäuremetabolismus werden für die TNF Wirkung verantwortlich gemacht (Matthews et al., 1987). TNF hemmt die Expression von Onkogenen (Kroenke et al., 1987). TNF führt zur Differenzierung von Tumorzelllinien und unterdrückt somit die Malignität (Takeda et al., 1986).

Metabolische Wirkung:

Es werden zunehmend mehr Eigenschaften von TNF als Immunmodulator und als metabolisch wirkendes Hormon beschrieben (Beutler und Cerami, 1987). TNF ist identisch mit dem Faktor Kachektin, der in entsprechenden Konzentrationen den gesamten Stoffwechsel auf Katabolismus umstellt, in Adipozyten die Lipoproteinlipase hemmt und so zur Kachexie mit Hypertriglyceridämie führt, wie es bei vielen chronischen Erkrankungen beobachtet werden kann (Larrick und Kunkel, 1986; Scuderi et al., 1986; Torti et al., 1986). TNF ist ein wichtiger Mediator der Endotoxinwirkung (Beutler et al., 1985).

Immunmodulatorische Wirkung:

TNF induziert die Bildung von folgenden Molekülen:

- GM-CSF in Endothelien und Fibroblasten (Munker et al., 1986)
- IL-1 in Endothelien (Nawroth et al., 1986; Dinarello et al., 1986)
- Epidermal Growth Faktor (EDGF) (Palombella et al., 1987)
- H₂O₂ in neutrophilen Granulozyten (Palladino et al., 1986)
- Kollagenase in Fibroblasten und Synovialzellen
- Prostaglandin E₂ in Fibroblasten und Synovialzellen (Dayer et al., 1985; Kawakami et al., 1987)
- Arginase- und L-Ornithinfreisetzung aus Makrophagen und damit T-Lymphozyten Stimulation (Dröge, 1987)

TNF regt polymorphonukleäre Leukozyten zur Phagozytose an (Shalaby et al., 1985), aktiviert Osteoklasten (Stashenko et al., 1987) und verstärkt die Expression von MHC I und II (Collins et al., 1986; Pujol Borrell et al., 1987; Pfizenmaier et al., 1987).

Antinfektiöse Wirkung:

TNF ist auch wirksam gegen Viren *in vitro* (Mestan et al., 1986), gegen Bakterien und Pilze (Parant et al., 1987) sowie gegen Protozoen (Taverne et al., 1984; de Titto et al., 1986).

Dabei bestehen bei vielen der vorgenannten Wirkungen von TNF synergistisch additive Effekte vor allem mit IFN- α , IFN- β , IFN- γ und IL-1.

Tabelle 2:

Zytokine mit direkter Wirkung auf Tumorzellen:

Name	Synonym	Molekül*	zell. Ursprung	durch	wichtige Wirkungen	Literatur**
IFN- α	Klasse I-IFN	16-20 kD 20 Sub- klassen	Leukozyten Lymphozyten Makrophagen	Viren Bakterien Antigene IFN-inducer Mykoplasmen u.a.	NK Zell Stimulation Proteinkinase- und 2'-5'(A)n-Synthetasesteigerung Hemmung der Expression zellulärer Onkogene Expressionssteigerung von MHC I Differenzierung von Tumorzelllinien Synergismen mit anderen Zytokinen	Rivière, 1984 Rivière, 1983 Straub, 1986 Zawatzky, 1986 Kirchner, 1984 Rossi, 1985
IFN- β 1	Fibroblasten IFN	21-23 kD	Fibroblasten u.a.	wie IFN- α	Mammakarzinomhemmung Zelldifferenzierung	
IFN- β 2	IL-6 HDGF BSF-2	26 kD				Revel, 1987

Name	Synonym	Molekul*	zell. Ursprung	durch	wichtige Wirkungen	Literatur**
IFN- γ	Klasse II-IFN Immun- IFN	20-25 kD	Lymphozyten Makrophagen	wie IFN- α	direkt antitumoral Stimulierung von NK, CTL, Makrophagen Hemmung der Onkogenexpression Expressionssteigerung von MHC II Synergismen mit anderen Zytokinen Differenzierung von myeloiden Zelllinien	Kirchner, 1984
IL-1	LAF	17-22 kD	Makrophagen Gefäßendothel	LPS Mitogene u.a.	direkt antitumoral Induktion von zahlreichen Zytokinen Synergismen mit anderen Zytokinen	Onozaki, 1985 Kaufmann, 1987 Dinarello, 1987 March, 1985 Martin, 1987

Fortsetzung Tabelle 2:

Name	Synonym	Molekul*	zell. Ursprung	durch	wichtige Wirkungen	Literatur**
TNF	Kachektin TNF- α	17-18 kD	Makrophagen T Lymphozyten B Lymphozyten NK Zellen Mastzellen	LPS IFN Mitogene Viren Phagozytose IL-2	direkt zytostatisch direkt zytotoxisch Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese Abdichtung der gap junctions zwischen Tumorzellen Proteasenfreesetzung Hemmung der Onkogenexpression Expressionssteigerung von MHC I Differenzierung von Tumorzelllinien	Beutler, 1985 Old, 1985 Williamson, 1983 Nedwin, 1985 Steffen, 1987 Old, 1987 Ware, 1987 Lattime, 1987 Beyaert, 1987 Takeda, 1986 Pfizenmaier, 1987

Name	Synonym	Molekül [*]	zell. Ursprung	durch	wichtige Wirkungen	Literatur ^{**}
LT	TNF- β	18-25 kD	T Lymphozyten	bestimmte Antigene Mitogene	direkt zytotoxisch Differenzierung von Tumorzelllinien	Pennica, 1984 Ruddle, 1987 Granger, 1987 Gray, 1984
NKCF			NK Zellen	Mitogene Kokultur mit Tumor-Zielzellen	direkt zytotoxisch	Wright, 1982 Ortaldo, 1986a Degliantoni, 1985
LRG		32-44 kD	Lymphozyten	Mitogene	direkt zytotoxisch NK Zell Stimulation	Ransom, 1985 Ortaldo, 1986a

^{*} Molekulargewichte differieren speziesabhängig und zwischen natürlichen und rekombinierten Molekülen

^{**} Literaturangaben sind Übersichtsartikel oder wichtige Einzelergebnisse

2.2 SUBSTANZEN ZUR STEIGERUNG DER ABWEHR GEGEN TUMOREN

Bereits gegen des Ende vorigen Jahrhunderts wurde über "spontane Tumorregressionen" berichtet, wobei sehr bald ein Zusammenhang zwischen Regression und bakterieller Infektion des Patienten auffiel. Dies veranlasste F. FEHLEISEN in Deutschland, B. COLEY in USA und einige andere Wissenschaftler, bakterielle Infektionen als Therapieversuch bei fortgeschrittenen Stadien von Krebs gezielt anzuwenden. Den Grundstein der modernen Immunotherapie legte schließlich COLEY, indem er eine Mischung aus abgetöteten *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens*, bekanntgeworden als COLEY's Toxin, anwendete (Old, 1985).

Seitdem wurden zahlreiche bakterielle, virale, pflanzliche, chemisch-synthetisierte u.a. Präparate auf ihre Eignung zur Immunstimulation gegen Infektionen verschiedenster Art und zur Abwehr gegen Tumoren untersucht.

Zu den wichtigsten Substanzen zählen:

- *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (Mitchell und Murahata, 1985),
- *Corynebacterium parvum* (Cp) (Zigheboim und Berd, 1985),
- andere Bakterien
- Bakterienwandpräparationen wie Muramyl Dipeptid und Derivate (MDP) (Chedid et al., 1982),
- Levamisol (Renoux, 1985),
- synthetische Polyanionen, Pyran u.a. Polymere (Regelson, 1985)
- und viele weitere

Die genannte Literatur stellt Übersichtsarbeiten dar, aus denen weitere Informationen bezogen werden können.

Durch chemische Analysen ist nun bei einigen Immunstimulantien das für die Wirkung verantwortliche Molekül bekannt. Man ist z. T. in der Lage, dieses synthetisch mit entsprechendem Reinheitsgrad herzustellen (z.B. MDP und Lipid A). Dies hat den Vorteil, daß damit definierte Moleküle vorliegen, deren oft unbeherrschbare, toxische Nebenwirkungen eingeschränkt werden können. LANGE und MASIHI schreiben hierzu (1987): "Der Zeitpunkt der praktischen Anwendung von Immunmodulatoren am Menschen ist deutlich näher gerückt. Mit diesen Substanzen haben wir Instrumente in der Hand, mit deren Hilfe (...) Tumoren reduziert, in ihrer Ausbreitung im Organismus gehemmt oder ganz beseitigt werden können."

Mit dieser Zielsetzung wurden auch virale Präparate untersucht. Besonders Pockenviren und Paramyxoviren haben paraspezifische Wirkungen auf das Abwehrsystem (Paramunitätsinducer). So werden Vacciniaviren in Japan mit Erfolg bei Tumorpatienten eingesetzt (Arakawa et al., 1987; Kawa und Arakawa, 1987). Tierpockenviren (Avipox und Parapox ovis) haben sich als hervorragend verträglich erwiesen und zudem in vielen Modellen gute paramunisierende Eigenschaften gezeigt (Mayr et al., 1986; Stickl und Schleich, 1985, Wolf, 1986; Reubel, 1983). Gegenüber strahleninduzierten Transplantatosteosarkomen der Maus verringerten sie deutlich die Tumorinzidenz (Erfle et al., 1983; Müller-Brunecker, 1983).

2.3 TUMORMODELLE

Zahlreiche *in vivo* Modelle, mit homologen oder heterologen, spontanen oder permanenten Zelllinien, an denen die Wirkungen von Immunstimulantien gegen primäre Tumoren oder gegen Metastasen überprüft werden können, wurden beschrieben. Prinzipiell können Suppressionsmodelle, bei denen das Immunstimulans vor oder gleichzeitig mit den Tumorzellen appliziert wird, von Regressionsmodellen, bei denen die Immunstimulation nach der Tumorinokulation erfolgt, unterschieden werden (kritische Zusammenfassung bei BAST und BAST (1976) und MÜLLER-BRUNECKER (1983)).

Die Friend Erythroleukämie der Maus stellt ein besonderes Tumormodell dar:

Es handelt sich um Retrovirus-infizierte erythroide Vorläuferzellen (Friend, 1956) auf der Differenzierungsstufe der Proerythroblasten (CFU-E; vergleiche *Abbildung 2*), die sich *in vitro* kaum weiterdifferenzieren (Friend, 1978). Nach Zugabe von Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) oder anderen polaren Lösungsmitteln, wie Buttersäure (Leder und Leder, 1975) differenzieren sich die Zellen jedoch zu Normoblasten und lagern Hämoglobin ein.

Das Friend Erythroleukämie Virus ist ein Komplex aus mehreren Einheiten:

- ein replikationsdefektes Retrovirus (Spleen-focus-forming-virus; SFFV)
- ein replikationskompetentes "Helfer Virus", welches das Lymphatische Leukämie Virus (LLV), endogene oder andere Viren, oder sogar ein nicht virales Agens sein kann (Friend, 1978).

Eine Replikation des Virus kommt also nur zustande, wenn das Virus auf Zellen mit den oben genannten Voraussetzungen trifft. Das Virus kann allerdings auch ohne Replikation zur Tumorbildung führen, z.B. durch Überexpression von zellulären Proto-Onkogenen (Gisselbrecht et al., 1987). Die Friend Zellen wurden häufig kloniert; die Klone weisen

sich durch sehr verschiedene Eigenschaften bezüglich Virusreplikation (Krieg et al., 1978), Differenzierbarkeit (Friend, 1978), Sensibilität gegenüber Interferon (Affabris et al., 1982) u.a. aus.

IFN führt *in vitro* in niedrigen Dosen (50–500 U/ml) zur Differenzierung, in hohen Dosen (1000–10000 U/ml) jedoch zur Hemmung der DMSO-stimulierten Differenzierung und zur Wachstumshemmung (Moritz und Kirchner, 1986; Rossi, 1985). TNF hemmt das Wachstum *in vitro*, jedoch besser, wenn die Zellen durch DMSO zu Normoblasten differenziert sind (Suyama et al., 1985). *In vitro* IFN-resistente (Gresser, 1985) und TNF-resistente (Gresser et al., 1987) Friend Erythroleukämie Zellklone sind *in vivo* durch Applikation von IFN bzw. TNF dennoch hemmbar, was dafür spricht, daß diese Hemmung durch den Wirt vermittelt wird.

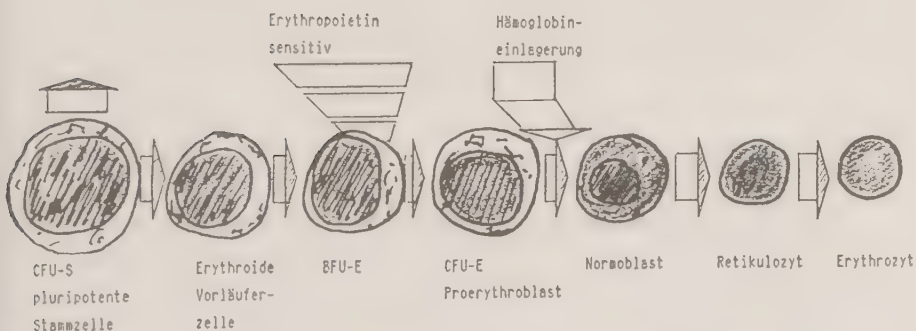


Abbildung 2:
Schematische Darstellung der Erythropoese (nach Friend, 1978)

3. Eigene Untersuchungen

3.1 MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchungen zur Wirksamkeit von Immunstimulantien gegen Tumoren wurden *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

In vitro Versuche mit Tumorzellkulturen:

Seren von mit Immunstimulantien vorbehandelten Tieren, oder Überstände von Kulturen von adhäsiven Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) wurden auf Zellkulturen gegeben und untersucht, ob sie zytotoxisch sind oder ob eine Differenzierung auftritt.

In vivo Tumormodelle an Mäusen:

Mäusen wurden Tumorzellen (Ehrlich Aszites Karzinom oder Friend Erythroleukämie) oder karzinogene Substanzen (Methylcholanthren) injiziert, sie wurden vorher (Suppressionsmodell) oder nachher (Regressionsmodell) mit Immunstimulantien behandelt und anschließend regelmäßig auf Tumorbildung oder -rückgang untersucht.

3.1.1 Tiermaterial

Es wurden NMRI Mäuse, weiblich, DBA/2NCrIBR Mäuse, weiblich oder männlich verwendet, sowie Kaninchen, New Zealand White, weiblich (alle von Fa. Charles River Wiga /Sulzfeld). Die Tiere wurden konventionell im Institutsstall in Makrolonkäfigen gehalten. Sie erhielten pelletiertes Alleinfutter (Fa. Altromin /Lage) und Leitungswasser ad libitum. Täglich wurden zehn Stunden lang Leuchtstoffröhren im Stall als Lichtquelle eingeschaltet. Nach Zukauf wurde den Tieren mindestens 3 Wochen Eingewöhnungszeit gegeben.

3.1.2 Permanente Zelllinien

- Ehrlich Aszites Karzinom (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Rabes, Pathologisches Institut der Universität München) wurde in NMRI Mäusen intraperitoneal (i.p.) für die Dauer der Versuche passagiert. Nach i.p. Injektion von 1×10^6 lebenden Zellen /ml, vermehren sich in NMRI Mäusen die Tumorzellen unter Ausbildung von Aszites, der sich durch erhebliche Zunahme des Abdomenumfanges und des Gewichtes beurteilen läßt. Alle 14 Tage wurde den an Aszites erkrankten Tieren nach Euthanasie durch Äther 2 ml Aszitesflüssigkeit mit ca. $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ Zellen/ml steril punktiert (Kanüle Nr.1, 0,9x40 mm) und je 0,5 ml Punktat direkt in 3 Mäuse i.p. injiziert (Kanüle Nr.16, 0,6x25 mm). Punktate mit Blutbeimengungen wurden verworfen.

- L929 Zellen (murine Fibroblasten; American Type Culture Collection: CCL1) wurden in Kunststoff Zellkulturflaschen (Fa. Nunc /Roskilde, DK) als Monolayer bei 37°C kultiviert. Das Medium setzte sich zusammen aus Earle's Minimum Essential Medium (E-MEM) mit L-Glutamin (bezogen als Trockensubstanz von Fa. Biochrom /Berlin) und 10% fetalem Kälberserum (FKS) (Fa. Biochrom). Die Zellen wurden während der Versuche alle 3 bis 4 Tage im logarithmischen Wachstum passagiert: Nach Abkippen des Mediums wurde auf die Zellen 0,25%-ige Trypsin Lösung in Phosphate Buffered Saline (PBS) gegeben und bis zur beginnenden Abkugelung bei 37°C warmgestellt. Anschließend wurde die Trypsinlösung durch etwas Medium ersetzt; die Zellen wurden aufgeschüttelt und, auf eine Zahl von 1×10^5 /ml verdünnt, in frischem Medium inkubiert.

- Die Friend Erythroleukämie Zelllinie Klon F4-1 (Krieg et al., 1978) (erhalten von Prof. Ostertag, Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie der Universität Hamburg) ist ein Klon, der kaum Virus freisetzt, jedoch A-Partikel zytoplasmatisch anreichert. FRIEND (1978) gibt für diesen Klon eine DMSO-Stimulierbarkeit von 71,5% nach 6 Tagen Inkubation an. Die Zellen wurden in Suspension unter den gleichen Bedingungen wie die L929 Zellen kultiviert; bei Passagen wurden exakt 1×10^5 Zellen /ml eingesät.

3.1.3 Zellzählung

Zellsuspensionen wurden in 0,25%-iger Trypanblaulösung verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer wurden bei 400-facher Vergrößerung sämtliche Zellen in den vier großen Eckquadraten gezählt. Proben mit mehr als 5% toten, d.h. blau gefärbten Zellen wurden verworfen. F4-1 Zellen wurden auch im Durchflußzytometer Ortho Spektrum III (Fa. Ortho Diagnostic Systems /Neckargemünd) gezählt, indem 50 µl Zellsuspension mit 1 ml Isolac D^R (Fa. Ortho) vorverdünnt wurden.

3.1.4 Substanzen zur *in vitro* und *in vivo* Behandlung

3.1.4.1 Kontrollen

0,9%-ige NaCl-Lösung pro inj. oder PBS (im Labor gefertigt) wurden, als Placebo, Mäusen injiziert oder Zellkulturen zugegeben. Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium (Fa. Merck /Darmstadt) in Aqua pro inj. wurde einer Gruppe Mäuse im Ehrlich Aszites Modell gegeben.

3.1.4.2 Paramunitätsinducer PIND-AVI

PIND-AVI ist ein im Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Universität München hergestelltes Präparat aus attenuiertem Hühnerpockenvirus, Stamm HP1-438, das in primären Hühnerembryofibroblastenkulturen vermehrt wird. Die verwendete Charge 141 enthielt vor der Inaktivierung mindestens $10^{7,5}$ KID₅₀ /ml. Die Inaktivierung erfolgt durch Gammabestrahlung mit einer Dosis von 1400 krd ($1,4 \times 10^4$ Gy) (Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München-Neuherberg). Als Stabilisator wird succinylierte Gelatine (Gelofusine, Laboratories Hausmann /St. Gallen, CH) in einer Endkonzentration von 2,5% zugegeben. Nach Einstellung auf einen pH-Wert von 7,4-7,6 wird das Präparat lyophilisiert und bis zur Verwendung bei +4°C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wird das Lyophilisat mit aqua pro inj. gelöst. Im Stomatitis-Vesicularis-Test (VSV-Test; Mayr et al.,

1977) wurden bei der Verdünnung von 1:8 für die verwendete Charge 70 Wirkungseinheiten gemessen. Der Endotoxin Gehalt, bestimmt im Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (Fa. Sigma /Deisenhofen, Nr. 210-2), betrug 1 ng /ml (6 EU /ml).

3.1.4.3 Paramunitätsinducer PIND-ORF

PIND-ORF wird ebenfalls im Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions und Seuchenmedizin hergestellt. Attenuiertes Parapoxvirus ovis, Stamm D1701 (Mayr et al., 1986) wird in sekundären bovinen Lungenfibroblasten vermehrt und wie PIND-AVI weiterbehandelt. Die verwendeten Chargen enthielten vor der Hitzebehandlung mindestens $10^{7,5}$ KID₅₀/ml. Alle Chargen wurden durch Hitze behandelt (56°C, 2,5 Stunden). Für folgende 4 Chargen wurden Resttiter, auf bovinen Lungenfibroblasten nachgewiesen. Der Wirkungsindex im Stomatitis-Vesikularis-Test (WI;VSV-Test; Mayr et al., 1977) wurde bei einer Verdünnung von 1:8 ermittelt:

	Resttiter /ml	WI;VSV-Test
Charge 030T	<10 ^{1,51}	83
Charge 033T	<10 ^{2,75}	72
Charge 040T	<10 ^{1,51}	100
Charge 041T	<10 ^{3,25}	93

Das Lyophilisat wurde unmittelbar vor Gebrauch in aqua pro inj. gelöst.

3.1.4.4 New Castle Disease-Virus (ND)

New Castle Disease-Virus (ND), Stamm La Sota, Klon 30, wurde im Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin in Hühnereipassagen vermehrt. Nach Thermobehandlung (56°C, 2,5 Stunden) hatte das lyophilisierte Material einen Resttiter von ca. 10^4 Ei-infektiöse Einheiten ₅₀ /ml. Der Hämagglutinations Test war negativ. Im

VSV-Test (Mayr et al., 1977) wurden bei einer Verdünnung von 1:10 4025 Wirkeinheiten gemessen. Das Lyophilisat wurde unmittelbar vor Gebrauch in aqua pro inj. gelöst.

3.1.4.5 Corynebacterium parvum (Cp)

Das verwendete Präparat (Fa. Wellcome /Beckenham, GB, Charge CA 776/2) enthält 7 mg/ml suspendierte, formalininaktivierte Corynebakterien und 0,01% Thiomersal als Konservierungsmittel und wurde in einer Durchstichflasche bei +4°C gelagert.

3.1.4.6 Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

BCG ist ein attenuierter Stamm von Mykobakterium bovis (Mitchell und Murahata, 1985), der als Impfstoff gegen Tuberkulose im Gebrauch ist. Es wurde Stamm BCG-CONNAUGHT (Vertrieb: Fa. Medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate /Hamburg, Charge 384-123) verwendet. Das Präparat enthielt 13 mg lyophilisierte Bakterien mit mindestens 8×10^7 lebenden BCG Keimen pro Durchstichampulle. Es wurde unmittelbar vor Gebrauch in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung pro. inj. gelöst.

3.1.4.7 Lipopolysaccharid (LPS)

Das verwendete Lipopolysaccharid (Fa. Sigma, Nr. L-3880, Charge 43F-4008) ist ein Trichlor-Acetat Extrakt aus Zellwänden von Escherichia coli Stamm 0127:B8. Es wurde in PBS gelöst und bei -20°C gelagert. Entsprechende weitere Verdünnungen wurden wieder mit PBS durchgeführt. Die applizierten Dosierungen sind im Abschnitt 3.2 angegeben.

3.1.4.8 Polyinosinylat-polycytidylat (Poly I:C)

Der Interferoninducer Poly I:C (Fa. Sigma, Nr. P-1530, Charge 55F-4012) wurde gelöst in PBS bei -20°C gelagert.

3.1.4.9 Ochratoxin A

Ochratoxin A (7-Carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3*R*-methylisocoumarin-7-L- β -phenylalanine; siehe *Abbildung 3*) wird natürlicherweise von *Aspergillus* und *Penicillium* (*A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, *P. viridicatum*) gebildet (Cole und Cox, 1981). Es ist ein Umweltgift, das in Futtermitteln und in der Nahrungsmittelkette häufig vorkommt. Die LD₅₀ für Ratten beträgt 22 mg/kg (Cole und Cox, 1981), für Zellkulturen beträgt die ED₅₀ ca. 20 µg /ml (Gareis, persönliche Mitteilung). Ochratoxin A (Fa. Sigma, Nr. O-1877) wurde in E-MEM mit 0,1% Athanol als Lösungsvermittler gelöst. Es wurde DBA/2 Mäusen i.p. appliziert in zwei Dosierungsgruppen 50% und 10% der LD₅₀; oder es wurde zu Kulturen von adhäsiven Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) von DBA/2 Mäusen in den Dosierungen 50% und 10% der ED₅₀ gegeben.

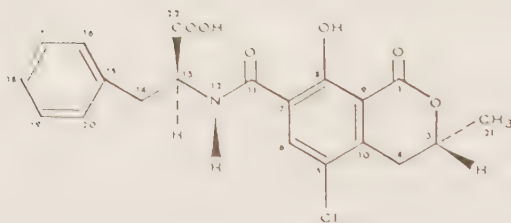


Abbildung 3: Struktur von Ochratoxin A

3.1.4.10 HT-2 Toxin

HT-2 Toxin (3 α ,4 β -Hydroxy-15-acetoxy-8 α -[3-methyl-butyryloxy]-12,13-epoxytrichothec-9-ene; siehe *Abbildung 4*) wird von Fusarien (*F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*) gebildet und ist ein Metabolit des T-2 Toxins (Cole und Cox, 1981). Auch HT-2 Toxin ist ein weit verbreitetes natürliches Umweltgift, das in vielen Futtermitteln vorkommt (Gareis et al., 1985). Die LD₅₀ wird für Mäuse mit 9 mg /kg angegeben (Cole und Cox, 1981), für Zellkulturen beträgt die ED₅₀ ca. 10ng /ml (Gareis, persönliche Mitteilung). HT-2 Toxin (Fa. Sigma, Nr. T-4138) wurde wie Ochratoxin gelöst und nach dem gleichen Dosierungsprinzip DBA/2 Mäusen appliziert bzw. DBA/2 PEM Kulturen zugegeben.

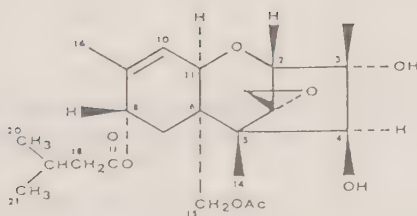


Abbildung 4: Struktur von HT-2 Toxin

3.1.4.11 Omnadin®

Omnadin® (Fa. Hermal-Chemie /Reinbek) ist ein im Handel erhältliches Präparat zur Injektion, das als unspezifisches Antigen zur Steigerung der unspezifischen Abwehr dient (unspezifische Eiweißtherapie). 1 ml der Injektionslösung enthält: Eiweißkörper (aus Stoffwechselprodukten von *B. mycoides* und *Sarcina flava* im Verhältnis 1:3) 0,05 mg; Lipaide und gallensaure Salze 0,258 mg; Fette 0,015 mg; Phenol als Konservierungsmittel 5,0 mg. Es wurde NMRI Mäusen mit Ehrlich Aszites Karzinom injiziert.

3.1.4.12 Tumor Nekrose Faktor (TNF)

Humaner Tumor Nekrose Faktor wurde produziert im New York Blood Center (Bezug von Fa. Paesel /Frankfurt/M.) durch Stimulation der humanen lymphoblastoiden Zelllinie LuKII mit Phorbol Estern. Anschließend wurde TNF aus dem Kulturmedium gereinigt dargestellt (Rubin et al., 1985). Die zur Verfügung gestellte Charge (T01-85) enthielt 10000 Units /Ampulle lyophilisierten TNF. Sie wurde in 1 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung pro inj. gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

3.1.5 Gewinnung der Seren von Versuchstieren

NMRI oder DBA/2 Mäuse wurden i.p. bzw. i.v. mit den unter 3.1.4 aufgelisteten Substanzen behandelt (Volumina, Dosen und Vorbehandlungszeiten im Abschnitt 3.2).

Mäusen wurde Blut grundsätzlich durch aseptische Herzpunktion (Kanülen Nr.16/ 2 ml Spritzen) in tiefer Äthernarkose entnommen. Das Blut der 3-4 Tiere umfassenden Vorbehandlungsgruppen wurde sofort in einem Gefäß vermischt.

Kaninchen wurden durch Punktion der Ohrrendvenen oder Ohrarterien Blut abgenommen mit Kanüle Nr.16. Bei der letzten Blutentnahme wurden die Tiere in Ketamin-Narkose (Fa. Parke-Davis, 100 mg /kg i.m.) mit Nr.1 Kanülen durch Herzpunktion entblutet.

Nach Gerinnung bei Raumtemperatur wurde das Blut einige Stunden bei 4°C aufbewahrt, anschließend bei 2000 g 10 min. zentrifugiert und das Serum in Portionen à ca. 1 ml eingefroren.

Kaninchenserum wurden in zwei zeitlich getrennten Versuchsansätzen gewonnen. Die Seren aus dem ersten Versuchsansatz (Kaninchenserum I) wurden bei -20°C gelagert. Die Kaninchenserum, die im zweiten Versuchsansatz gewonnen wurden (Kaninchenserum II), wurden bei -80°C eingefroren.

3.1.6 Gewinnung und Kultivierung von adhäsiven murinen Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM)

Die Gewinnung der PEM erfolgte in Anlehnung an MÄNNEL et al. (1980a) (siehe Abbildung 5): Sieben Mäusen (NMRI, weiblich, oder DBA/2, männlich) wurde 2 ml 3%-iges Thioglycolat broth (Fa. Merck /Darmstadt) i.p. injiziert; sieben Tage später wurden die Mäuse durch Äther narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden 3,5 ml E-MEM mit 10% FKS in die Peritonealhöhle injiziert; das Abdomen der Maus wurde leicht massiert, und nach maximal 2 Minuten wurde mit einer 2 ml Spritze und Nr.16 Kanüle unter Sichtkontrolle kaudal des linken Rippenbogens möglichst viel Flüssigkeit aspiriert. Bluthaltige Punktate wurden verworfen und jeweils fünf brauchbare Punktate wur-

den gepoolt (gesamtes Punktatvolumen von je 5 Mäusen ca. 10-14 ml). Nach Färbung einer Stichprobe mit Trypanblau wurden $2-5 \times 10^6$ vitale Zellen /ml gezählt (und ca. 1% tote).

Zytozentrifugenpräparate wurden nach Pappenheim gefärbt und mikroskopisch untersucht: Die Zellen waren morphologisch zu über 95% Makrophagen mit bohnenförmigen Kernen und vakuolärem Zytoplasma.

NMRI PEM (Angaben für DBA/2 PEM in Klammern) wurden auf $1,5 \times 10^6$ Zellen /ml ($1,29 \times 10^6$ /ml) in E-MEM mit 10% FKS verdünnt. Sie wurden zu 2,5 ml (2,25 ml) in 3,5 mm ϕ Kunststoff-Zellkulturplatten gegeben, dann wurden sie 6 (3) Stunden lang inkubiert bei 37°C, unter 5%-iger CO₂ Atmosphäre und Wasserdampfsättigung. Nach dieser Inkubation wurde das Medium mit den nicht adhärenen Zellen abgehoben und verworfen. Die adhärenen Zellen wurden zweimal mit 37°C warmen E-MEM gespült und anschließend wurde zu den adhärenen Zellen neues Medium, bestehend aus 45% E-MEM, 45% L929-Zell konditioniertes Medium (Männel et al., 1980a) und 10% FKS, gegeben. Nach diesem Mediumwechsel wurden die Zellen zum zweiten Mal 18 Stunden lang inkubiert. Danach wurde dem Medium jeweils ein Teststimulus (siehe Tabellen 9 und 10 in 3.2) zugegeben und zu bestimmten Zeiten (siehe unten) 0,5 ml Überstand abgehoben, durch ein 0,2 μ m Filter passiert und bei -20°C gelagert.

Die PEM-Kulturen bestanden vor und nach der Stimulation aus morphologisch unveränderten dichten Zellagen, mit großen stark verzweigten Zellen. Sie wuchsen nach 20 Stunden über das Monolayerniveau in Clustern hoch. In den Vertiefungen, in die *Corynebacterium parvum* (Cp) gegeben wurde, konnten extra- und intrazelluläre Granula beobachtet werden. Nach der letzten Abnahme von Überständen wurden die Zellen mit einem Kunststoffspatel abgeschabt, die Vitalität bestimmt (<10% tote) und es wurden erneut Zytozentrifugenpräparate untersucht. Sie enthielten ausschließlich Makrophagen. Cp stimulierte Zellen ließen extra- und intrazelluläre Bakterien erkennen.

Die Abnahme von Überständen erfolgte zu folgenden Zeiten:

- NMRI PEM: nach 1, 3, 6, 22 Stunden;
- DBA/2 PEM: nach 0, 4, 24 Stunden.

Die Abnahme "0" (nach 0 Stunden) erfolgte unmittelbar nach Zugabe des Teststimulus, um eine mögliche direkte Wirkung des Stimulus auf die Testsysteme zu erkennen.

3.1.7 *In vitro* Versuche

3.1.7.1 L929-Zytotoxizitäts-Test

Der L929-Zytotoxizitäts-Test wird häufig zum Nachweis der Aktivität von TNF verwendet (Aggarwal et al., 1985; Creasey et al., 1987; Flick und Gifford, 1984; Old, 1985; Ruff und Gifford, 1980).

Prinzip: L929 Zellen werden mit log₂ Verdünnungen von TNF, zytotoxischen Seren oder Überständen von Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) inkubiert. Überlebende Zellen haften am Boden des Kulturgefäßes und werden nach Abspülen der nicht festgewachsenen Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Bei einer photometrischen Messung ist die Extinktion proportional der Zahl festgewachsener Zellen. (Vergleiche *Abbildung 6*)

Der Test wurde nach AGGARWAL et al.(1985) leicht modifiziert durchgeführt: In Mikrotiterplatten für Zellkulturen (Fa. Greiner /Nürtingen) mit 96 Vertiefungen und mit flachem Boden wurden in jede Vertiefung 50 µl Medium vorgelegt. Das Medium setzte sich zusammen aus E-MEM, 10% FKS und 10 µg Aktinomycin D/ml (Fa. Sigma, Nr. A-4262; 2 mg Trockensubstanz gelöst in 1 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung).

Von jedem Serum wurden mindestens vier parallele Titrationsreihen 1:2 angesetzt. Dazu wurden die Seren 1:2 mit Medium vorverdünnt. Je 50 µl vorverdünnte Seren wurden dann in die Vertiefungen der Reihe A zu dem bereits vorgelegten Medium gegeben und gemischt. Jeweils 50 µl aus den Vertiefungen der Reihe A wurden in die Vertiefungen der Reihe B gegeben und so bis zur Reihe H 1:2 weitertitriert. Anschließend wurde in alle Vertiefungen 50 µl Zellsuspension mit 3×10^4 logarithmisch wachsenden L929 Zellen gegeben. So betrug das Inkubationsvolumen des Mediums in jeder Vertiefung 100 µl. In die Vertiefungen A1 und A2 wurde als Positivkontrolle zusätzlich 50 µl 3M Guanidinhydrochlorid-Lösung in H₂O (Fa. Sigma, Nr. G-4505) gegeben, denn Guanidinhydro-

chlorid führt zu 100%-iger Zytolyse. Reihe 1 Vertiefung C-H und Reihe 12 A-H dienten als Negativkontrolle: Zu ihnen wurde kein Testserum gegeben (0,0% Zytolyse). Zusätzlich wurde bei jedem Testansatz reines Medium analog wie die Seren titriert, um zu überprüfen, ob sich durch Titration von Medium Veränderungen der Extinktion ergeben. Die Inkubation dauert 20 Stunden bei 37°C, unter 5% CO₂ Atmosphäre und Wasserdampfsättigung.

Kristallviolettfröbung: Nach der Inkubation wurde das Medium abgekippt, die Platten wurden mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen, 10 min. mit 0,5%-iger Kristallviolett-Lösung (0,5% g/g Kristallviolett in Methanol /Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:4) gefärbt und mit Leitungswasser gründlich gespült. Nach Lufttrocknen wurden die Platten im ELISA-Photometer (Fa. Dynatech /Denkendorf) bei einer Wellenlänge von 550 nm (Schwelle 1,99, Eichung 1,00) photometrisch gemessen.

Die Berechnung der prozentualen Zytotoxizität des jeweiligen Titors erfolgte nach FLICK und GIFFORD (1984):

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{(E_N - E_F) - (E_U - E_F)}{(E_N - E_F)} \times 100$$

wobei:

E_N = Mittelwert der Extinktion der Negativkontrolle

E_F = Mittelwert der Extinktion der Positivkontrolle

E_U = Mittelwert der Extinktion der untersuchten Probe

Die Einheiten Tumor Nekrose Faktor (TNF) oder Tumor Nekrotisierende Aktivität (TNA) wurden nach AGGARWAL et al. (1985) berechnet:

Die Titrationsstufe, bei der $\geq 50\%$ Zytotoxizität auftreten, entspricht der Zahl an Einheiten TNF (bzw. TNA) im Ausgangsvolumen der getesteten Probe, hier also in 100 μ l pro Vertiefung.

Im L929-Zytotoxizitäts-Test wurden getestet:

- Seren von NMRI bzw. DBA/2 Mäusen
- Seren von Kaninchen
- Überstände von Kulturen von adhäsiven Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) von NMRI und DBA/2 Mäusen

In die Vertiefungen Reihe A wurde eine Ausgangsverdünnung von 1:8 vorgelegt. Die Seren und Überstände von PEM wurden nach dem Auftauen und Vorverdünnen im Wasserbad erhitzt (56°C, 10 min.) und, falls ausreichende Volumina zur Verfügung standen auch nicht erhitzt, in jeweils 4 Parallelansätzen getestet.

Bei allen Versuchen wurde Aktinomycin D Charge 16F-4017-2 verwendet; nur im Versuch mit Kaninchenseren II kam eine neue Charge Nr. 65F-40121 zum Einsatz.

Die Haltbarkeit der Tumor Nekrotisierenden Aktivität (TNA) bei Lagerung über 18 Stunden bei -20°C oder bei +20-22°C wurde mit einem aus 4 DBA/2 Mäusen gepoolten Serum getestet (siehe *Tabelle 4*), ebenso wurde die Wirksamkeit von humanem gereinigten TNF bei Lagerung bei -20°C über 300 Tage protokolliert (siehe *Tabelle 3*).

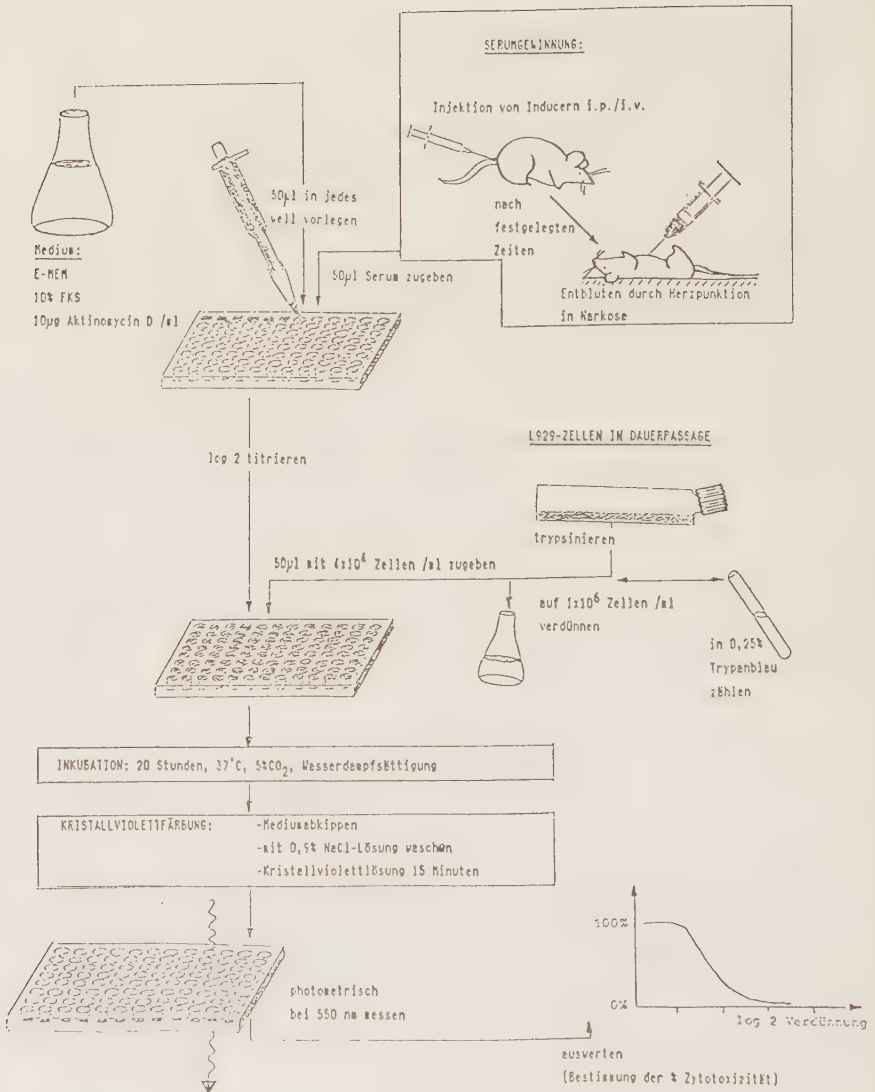


Abbildung 6:
Der L929-Zytotoxizitäts-Test (schematisch)

3.1.7.2 Versuche mit dem Friend Erythroleukämie Zellklon F4-1

Allgemeines Versuchsprinzip: Der Friend Erythroleukämie Zellklon F4-1 (F4-1) (Krieg et al., 1978) wird unter Zusatz von Seren oder von Überständen von PEM Kulturen inkubiert; das Zellwachstum wird durch regelmäßiges Zählen überprüft; der Anteil der hämoglobinhaltigen Zellen wird durch Benzidinfärbung ermittelt und gefärbte Zellpräparate werden mikroskopisch untersucht. 1,9% Dimethyl-Sulfoxid (DMSO für die Spektroskopie, Fa. Merck, Nr 2950) und 0,5 M Buttersäure (zur Synthese, Fa. Merck, Nr. 800457) induzieren bei F4-1 Zellen die Differenzierung und erhöhen den Anteil hämoglobinhaltiger Zellen ab dem 3. Inkubationstag. Differenzierte Zellen zeigen morphologisch einen kleineren, kompakteren Zellkern und ein vergrößertes Kern-Plasma-Verhältnis.

Zur Versuchsdurchführung wurden die F4-1 Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen à 300 µl mit rundem Boden für Zellkulturen (Fa. Greiner) inkubiert. In jede Vertiefung wurden 250 µl logarithmisch wachsende F4-1 Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 /ml Medium gegeben. Das Medium bestand aus E-MEM mit 10% FKS. Dem Medium wurden zuvor 5% der Seren von Kaninchen, von NMRI bzw. DBA/2 Mäusen oder 5% der Überstände von PEM Kulturen zugegeben. Die Seren oder die PEM Überstände waren stets nicht erhitzt. Mindestens 4 Vertiefungen wurden gleichzeitig mit je einem zu testenden Serum oder Überstand inkubiert (vierfacher Ansatz). Auf jeder Mikrotiterplatte wurden weiterhin zwei Positivkontrollen (1,9% DMSO und 0,5 M Buttersäure, siehe oben) und eine Negativkontrolle (Medium ohne Zusätze) im vierfachen Ansatz mituntersucht. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, unter 5% CO₂ Atmosphäre und bei gesättigtem Wasserdampf.

Nach 2 und nach 6 Tagen Inkubation wurden die in Suspension wachsenden Zellen gezählt und der Anteil Benzidin positiver Zellen (B+) durch Benzidinfärbung bestimmt:

Nach gründlichem Durchmischen der Zellen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit einer 50 µl Pipette wurden je 50 µl aus jeder Vertiefung entnommen; sie wurden in 1 ml Isolac-D^R (Fa. Ortho) vorverdünnt und im Durchflußzytometer (Fa. Ortho) gezählt.

Die Benzidinfärbung zum Nachweis von Hämoglobin wurde wie folgt durchgeführt (modifiziert nach Leder und Leder, 1975 und nach Orkin et al., 1975): 450 µl Benzidin-Dihydrochlorid (Fa. Sigma, Nr. B-3383) Stammlösung (0,2%-ig in H₂O mit 3% Eisessig) wurde kurz vor dem Färben mit 50 µl 30%-igem H₂O₂ versetzt (Gebrauchslösung). In einem Reagenzglas wurden zu 50 µl Zellsuspension 10 µl Gebrauchslösung gemischt. Nach wenigen Minuten wurde die gefärbte Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben, mit Deckglas versehen und der Anteil der Benzidin positiven (B+), blauen Zellen bestimmt. Dazu wurden wenigstens 200 Zellen ausgezählt. Die Benzidin-Lösung bleibt im Kühlschrank mindestens zwei Monate haltbar.

Am Tag 6 der Inkubation wurden, nach Entnahme der zur Zählung und zur Benzidinfärbung benötigten Menge (je 50 µl), die restlichen Zellen der vier Vertiefungen einer Testgruppe gemischt. Daraus wurde ein Zytocentrifugenpräparat angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Es wurde mikroskopisch die Gleichförmigkeit der Zellen untersucht und mit einem skalierten Okular wurde das Kern : Plasma Größenverhältnis bestimmt.

3.1.8 *In vivo* Versuche

3.1.8.1 Ehrlich Aszites Karzinom

In zahlreichen Vorversuchen wurde nach einer Applikationsart (i.m., i.p., s.c.) und einer Tumorzelldosis gesucht, bei der die Bedingungen der Reproduzierbarkeit und der Objektivität der Beurteilung erfüllt werden. Weiter wurde die Immunogenität der verwendeten Ehrlich Aszites Karzinom Zellen untersucht.

Grundsätzlich wurden adulte weibliche NMRI Mäuse mit einem Gewicht von 25 - 40 g verwendet.

a) Bei der intraperitonealen Applikation wurden verschiedenen Gruppen von Mäusen 1×10^2 - 1×10^7 Zellen injiziert.

Alle 3-4 Tage wurden die Mäuse gewogen und der Gewichtszunahmefaktor bestimmt:

$$\text{Gewichtszunahmefaktor} = \frac{\text{Gewicht am Tag } d_n \text{ nach Applikation}}{\text{Gewicht am Tag } d_0 \text{ vor Applikation}}$$

Weiter wurden die Mäuse wöchentlich 4-5 mal nach folgenden Kriterien beurteilt:

- die Beobachtung des Abdomenumfanges,
- die Überlebenszeit,
- Spontanremissionen,

Schließlich wurde das Volumen des punktierten Aszites und die Anzahl lebender Zellen /ml (mit dem Anteil toter Zellen) bestimmt.

b) Bei der subkutanen Applikation wurden Gruppen à 2 Mäuse gebildet. Jede Gruppe erhielt 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 oder 5×10^7 lebende Zellen s.c. im Bereich der Lendenwirbel, nach Scheren der Haare, inokuliert.

Die Tiere wurden regelmäßig gewogen und an der Injektionsstelle palporisch auf Knotenbildung untersucht. Knoten, die gerade palpierbar waren, wurden als "+" registriert und ab einem Durchmesser von 2 mm wurden die Tumorknoten mit einer Schublehre in drei Dimensionen gemessen. Die Tiere wurden nach Beendigung der Versuche makroskopisch-anatomisch untersucht. Eine Maus wurde histologisch-pathologisch durch Dr. Hänichen, Institut für Tierpathologie der Universität München, untersucht.

c) Intramuskulär wurden 9×10^5 Zellen appliziert. Es wurden drei Gruppen à 2 Tiere gebildet, wobei jede Gruppe die Zellen in einen anderen Muskel (M. gluteus, M. triceps brachii, M. biceps femoris) injiziert bekam.

Die Untersuchung der Immunogenität des Ehrlich Aszites Karzinoms wurde nach folgendem Prinzip durchgeführt:

Mäuse wurden 1 oder 2 mal mit Y-bestrahlten, d.h. nicht mehr vermehrungsfähigen Zellen, vakziniert und 3 Wochen später mit vermehrungsfähigen Zellen belastet (challenge).

Die Bestrahlungsdosis betrug 25 Gy (durchgeführt von Dr. Kirsch, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung /Neuherberg, mit einer Cs 137-Quelle für Y-Strahlen: 25,6 min. mit 97,5 rd/min.). Nach der Bestrahlung wurde die Vitalität und die Morphologie der Zellen bestimmt. Am Tag 0 und Tag 29 wurde vakziniert mit 1×10^7 bestrahlten Zellen/ml und am Tag 53 erfolgte die Belastung mit 5×10^6 vermehrungsfähigen unbestrahlten Zellen. An allen drei Injektionstagen wurden zusätzlich je einer Kontrollgruppe unbestrahlte Zellen, die auch nach Neuherberg transportiert wurden, injiziert. Die Einteilung in Gruppen ist der *Tabelle 11* im Abschnitt 3.2. zu entnehmen.

Versuche zur Suppression von Aszites durch Immunstimulantien wurden bei drei verschiedenen Zellzahlen durchgeführt:

(1) Es wurden 5 Gruppen à 6 Tiere gebildet und je 5×10^5 Zellen i.p. appliziert. Die Immunstimulantien PIND-AVI, PIND-ORF und Corynebacterium parvum (Cp) wurden im Vergleich zur Placebogruppe (NaCl) injiziert (Dosierungsangaben in *Tabelle 12*).

(2) In 18 Gruppen à 6 Tiere wurden je Maus 6×10^5 Zellen i.p. appliziert. PIND-AVI, PIND-ORF, Cp, BCG, Prednisolon und Placebo (NaCl) wurden am Tag -2, -1 oder 0 der Tumordinokulation in unterschiedlichen Applikationsmodi (i.m., s.c., i.p.) injiziert (genauere Angaben siehe *Tabelle 13*).

(3) Beim dritten Versuch mit $8,8 \times 10^5$ Zellen wurden 11 Gruppen à 40 Tiere gebildet. PIND-AVI, PIND-ORF, Cp, BCG, Poly I:C, Omnadin[®] und Prednisolon wurden mit Placebo (NaCl) verglichen (Angaben über Dosierung, Applikationsmodus und -schema siehe *Tabelle 14*).

3.1.8.2 Friend Erythroleukämie Zellklon F4-1

Die Versuche mit F4-1 Zellen wurden nur an DBA/2 Mäusen (weiblich oder männlich) durchgeführt. In Vorversuchen wurde das Verhalten der Zelle nach i.p. und nach s.c. Inokulation bei verschiedenen Zellzahlen untersucht, wobei Zellen nach *in vitro* Passagen, sowie nach *in vivo* Passagen durch Trypsinierung von soliden Tumoren verwendet wurden. Die Trypsinierung erfolgte nach folgender Methode: Aseptisch entnommene Tumoren wurden mit dem Skalpell auf einer sterilen Gummimatte von Bindegewebe befreit und in möglichst kleine Stücke zerteilt. Diese wurden anschließend in steriler 0,25%-iger Trypsinlösung in PBS bei 37°C für 10-15 min. suspendiert; das Trypsin-Zellgemisch wurde dann durch sterile Gaze filtriert; der Trypsinierungsvorgang wurde mit dem Retentat wiederholt und anschließend erfolgte die Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau. Die histologisch-pathologischen Untersuchungen von tumortragenden Mäusen wurden freundlicherweise von Dr. Kaiser und Dr. Hänichen, Institut für Tierpathologie der Universität München, durchgeführt.

Die Wirksamkeit von PIND-AVI, PIND-ORF, *Corynebacterium parvum* (Cp), BCG, Poly I:C und NaCl-Lösung gegen 1×10^3 i.p. inokulierten F4-1 Zellen wurde verglichen:

Dazu wurden Gruppen mit je 12 Mäusen (je 7 weiblich, 20-25g und 5 männlich, 20-26g) gebildet; die männlichen Tiere wurden einzeln in Käfigen gehalten. Jede der Gruppen erhielt am Tag "0" 1×10^3 lebende F4-1 Zellen in 0,3 ml E-MEM i.p.. Die Zellen wurden zuvor *in vitro* passagiert. An der kontralateralen Seite wurden am Tag 2 bzw. 0 die Immunstimulantien i.p. in einem Volumen von 0,2 ml (außer BCG in 0,1 ml) appliziert. Gestorbene Tiere wurden pathologisch-anatomisch untersucht; am Versuchsende (Tag 105) wurden die überlebenden Mäuse ebenfalls seziert. Die weiteren Angaben sind in *Tabelle 15* aufgeführt.

3.1.8.3 Versuch mit Methylcholanthren

Es wurde eine Pilotstudie mit dem Karzinogen 20-Methylcholanthren (MCA) durchgeführt. Dabei wurden die Mäuse fünffach behandelt mit PIND-AVI bzw. PIND-ORF (siehe unten), um die Wirkung bei einer langsamen Karzinogenese zu testen.

Dazu wurden 6 Gruppen mit je 10 adulten weiblichen NMRI Mäusen (25-39g) gebildet. Am Tag 0 wurden 0,7 mg 20-Methylcholanthren (Fa. Sigma, Nr. M-6501) in 0,3 ml Trioctanoin gelöst (Tricaprylin C8:0, Fa. Sigma, Nr. T-9126) und s.c. am Rücken, nach Rasieren der Haare, injiziert. Weitere 6 Gruppen mit je 3 Tieren erhielten nur 0,3 ml Trioctanoin und die nachfolgend beschriebene Behandlung. Die Gruppen wurden behandelt mit 0,3 ml PIND-AVI (Ch. 141), PIND-ORF (Ch. 041T) oder mit 0,9%-iger NaCl-Lösung pro inj. im gleichen Volumen. Die Behandlung erfolgte entweder i.p. oder intraläsional (i.l.), d.h. an der Stelle der MCA Injektion, an den Tagen -2,+7,+21,+35,+49. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen und das Angehen der Tumoren beobachtet. Die Vermessung der Tumoren wurde wie im Abschnitt 3.1.8.1 beschrieben durchgeführt. Am Tag 126 wurden alle überlebenden Tiere nach Euthanasie mit Äther makroskopisch-anatomisch untersucht. Die Tumoren wurden freipräpariert, erneut mit der Schublehre vermessen, gewogen und im wassergefüllten Meßzylinder ihr Volumen bestimmt.

Die Tumoren waren meist ellipsenförmig. Das Tumolvolumen ließ sich daher mit folgender Formel (nach Attia und Weiss, 1966) berechnen:

$$\text{Tumolvolumen (mm}^3\text{)} = \text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times \text{Dicke (mm)} \times 0,6$$

3.2 ERGEBNISSE

3.2.1 *In vitro* Versuche

3.2.1.1 Versuche im L929-Zytotoxizitäts-Test

Die photometrische Messung ergab bei den Positivkontrollen (mit Guanidin-Zusatz) Extinktionen von 0,000–0,015. Die Negativkontrollen (Vertiefungen ohne Zusätze) hatten Extinktionen, je nach Testansatz, zwischen 0,400 und 0,800, wobei die Standardabweichung etwa 10% betrug. Eine Zytotoxizität von $\leq 10\%$ wurde als nicht aussagekräftig vernachlässigt. Die Titration von Medium allein ergab Extinktionen wie bei den Negativkontrollen mit einer Standardabweichung von $\leq 10\%$.

Die log₂ Titration von zytotoxischen Seren oder Überständen von PEM ergibt eine Dosis-Wirkungskurve, die je nach Zytotoxizität nach "rechts" bzw. nach "links" verschoben ist (siehe *Abbildung 7*). Bei Seren, die bei der Ausgangsverdünnung 1:8 eine Zytotoxizität unter 50% aufweisen, können keine Einheiten Tumor Nekrotisierende Aktivität (TNA) angegeben werden. So ist es zweckmäßig die Zytotoxizität in Prozent (%) bei Verdünnung 1:8 anzugeben. Gelegentlich kommt es zu höheren Extinktionen als der Mittelwert der Negativkontrollen, d.h. die Zellagen sind dichter als in der Kontrolle. Dadurch läßt sich eine "negative" Zytotoxizität (neg.) errechnen.

Aktinomycin D erhöhte die Sensitivität des L929-Zytotoxizitäts-Tests um ein Vielfaches: Das Kaninchenserum BCG/LPS, welches als Laborstandard diente, wurde ohne Aktinomycin D und mit 1 µg/ml (Charge 16F-4017-2) getestet (siehe *Abbildung 8*): Die Sensitivitätssteigerung durch Aktinomycin D war 8–9 fach.

Der Aktivitätsverlust von Seren durch lange Lagerung ist in der *Tabelle 3* angegeben: monatelanges Lagern bei -20°C und gelegentliches Auftauen zur Probenentnahme verringert die Aktivität von TNF ebenso, wie

kurzfristiges Lagern von Tumor Nekrose Serum bei Raumtemperatur (siehe *Tabelle 4*).

Die Ergebnisse der Versuche mit Seren und Überständen von adhäsiven Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) im L929-Zytotoxizitäts-Test sind in *Tabelle 5-10* zusammengefasst.

Tabelle 5 zeigt die Wirksamkeit von Seren von vier Kaninchen (I) vor und nach Stimulation mit LPS oder PIND. Hier kann man erkennen, daß die 4 verwendeten Kaninchen eine "spontane" Zytotoxizität im Serum schon vor der Injektion von Inducern hatten, die allerdings hitzelabil ist. Bei anderen Seren von unbehandelten Kaninchen war das nicht immer der Fall (Ergebnisse nicht aufgeführt). Das Kaninchen, das mit BCG i.v. und LPS i.v. vorbehandelt wurde (BCG/LPS), hatte auch nach Erhitzen des Serums eine hohe TNA. Es wurde daher als Laborstandard bei allen weiteren L929-Zytotoxizitäts-Tests mitgeführt. PIND-AVI oder PIND-ORF induzierten in der angegebenen Dosierung zu den angegebenen Zeiten keine hitzestabile TNA.

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse eines analog durchgeführten Versuches mit vier Kaninchenseren (II), die durch ND-Virus, PIND-AVI, PIND-ORF oder LPS i.v. stimuliert wurden. Die Kaninchen, die mit PIND behandelt wurden, zeigten keine Anzeichen einer Störung des Allgemeinbefindens, während nach ND-Virus Injektion das Kaninchen leicht schläfrig und teilnamslos wirkte. Das LPS-stimulierte Kaninchen zeigte schon 2 Stunden nach Injektion Symptome des Endotoxinschocks: Fieber, Apathie, Anorexie, Diarrhoe, Schwäche. Das Blut war nach 12 Stunden deutlich lipämisch. Dieses und das ND behandelte Kaninchen wurden nach der letzten Blutentnahme euthanasiert. Die beiden mit PIND behandelten Kaninchen wurden über 5 Wochen weiter beobachtet. Es konnten keine Störungen des Allgemeinbefindens festgestellt werden.

Die Untersuchung auf Zytotoxizität des Serums ergab aber Unterschiede zu den in *Tabelle 5* dargestellten Ergebnissen in folgenden Punkten:

(1) es bestand bei allen 4 Kaninchen eine höhere "spontane" Zytotoxizität (vor der Injektion).

- (2) diese spontane Zytotoxizität ließ sich weitgehend, aber nicht vollständig durch Erhitzung des Serums inaktivieren.
- (3) das 8 Stunden nach PIND-ORF Injektion entnommene Serum hatte trotz Erhitzen noch 53,0% Zytotoxizität (80 Einheiten TNA/ml).
- (4) bei allen 4 Kaninchen war nach Stimulation eine deutlich höhere Zytotoxizität im erhitzten Serum nachweisbar, als vor Stimulation. Die Differenzen zwischen spontaner und stimulierter Aktivität wurden in *Abbildung 9* dargestellt.

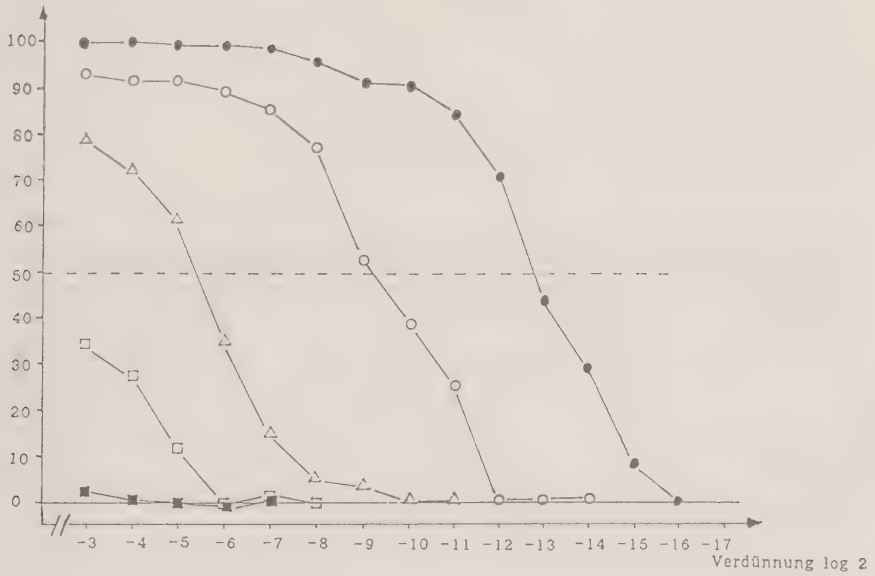
Tabelle 7 zeigt die Wirksamkeit von Seren von NMRI Mäusen nach Vorbehandlung mit Inducern. Man kann daraus ersehen, daß nennenswerte hitzestabile Zytotoxizität (über 10%) nur 4 Stunden nach LPS Injektion auftrat. Dagegen ist sowohl nach PIND-ORF, als auch nach LPS und ND Injektion eine deutliche Erhöhung der hitzelabilen Zytotoxizität zu beobachten. *Tabelle 8* zeigt die Ergebnisse eines vergleichbaren Versuches mit DBA/2 Mäusen nach Vorbehandlung mit Inducern. Nach Vorbehandlung mit BCG/LPS ließen sich 320 hitzestabile Einheiten TNA nachweisen, jedoch nicht 8 Stunden nach LPS Injektion in der sehr hohen Dosis von 0,5 mg i.p. /Maus (20g). In sämtlichen anderen Seren ließen sich allerdings weder eine hitzestabile noch -labile TNA finden.

Tabelle 9 und *Abbildung 10* zeigen die Ergebnisse von *in vitro* stimulierten PEM von NMRI Mäusen. Es wurde im Überstand dieser Zellen, abhängig vom Zeitpunkt der Überstandentnahme, eine unterschiedlich hohe Zytotoxizität gefunden. Besonders hervorzuheben ist, daß LPS behandelte PEM-Kulturen nach 22 Stunden fast keine Zytotoxizität im Überstand mehr aufwiesen. Aber nach Behandlung mit Poly I:C oder Cp war, nach 22 Stunden Inkubation, die Zytotoxizität höher als nach 6 Stunden.

Schließlich zeigen *Tabelle 10* und *Abbildung 11* die Ergebnisse der Versuche mit PEM von DBA/2 Mäusen. Diese Versuche wurden nicht unter identischen Bedingungen, wie bei NMRI PEM, durchgeführt. PBS bewirkte weder Freisetzung von zytotoxischer Aktivität in den Überständen, noch waren sämtliche verwendeten potentiellen Immunstimulantien in den angegebenen Dosierungen direkt zytotoxisch; denn bei der Abnahme von Überstand, unmittelbar nach Hinzugeben des Immunstimulans

(Stunde 0), war in keinem Fall eine Zytotoxizität über 10% zu finden. Die Zytotoxizität im Überstand von PEM, nach Behandlung mit 10,0 µg /ml LPS, war um 13% höher als nach Behandlung mit 1,0 µg /ml LPS. Wieder riefen hier Poly I:C und Cp eine sehr deutliche Zytotoxizität der Überstände hervor; sie erreichte den Höhepunkt 4 Stunden nach Abnahme.

% Zytotoxizität



● TNF human (Fa. Paesel)

○ TNS Kaninchen 1: 8×10^7 lebende BCG i.v. Tag -13 / $125 \mu\text{g}$ Lipopolysaccharid (LPS) i.v. Tag 0△ TNS Kaninchen 2: 3,5mg *Corynebacterium parvum* (Cp) i.p. Tag -13 / $125 \mu\text{g}$ LPS i.v. Tag 0□ TNS DBA/2 Maus: $1,6 \times 10^7$ lebende BCG i.p. Tag -9 / $25 \mu\text{g}$ LPS i.v. Tag 0

■ Medium

Blutabnahme nach 2 Stunden. Standardabweichung bis 10%. 100% Zytotoxizität nach Guanidinhydrochloridzusatz.

Abbildung 7:

Titration von Tumor Nekrose Faktor (TNF) oder Tumor Nekrose Serum (TNS) auf L929 Zellen

Tabelle 3:

Haltbarkeit von humanem gereinigten TNF nach Auflösen des Lyophilisats in 0,9%-iger NaCl-Lösung und Lagerung bei -20°C

	Tag 0*	Tag 9	Tag 262	Tag 302
E TNF/ ml	20480	20480	2560	2560

* Am Tag 0 wurde das Lyophilisat gelöst

Tabelle 4:

*Haltbarkeit von BCG/LPS**-induziertem murinen Tumor Nekrose Serum* bei unterschiedlicher Lagertemperatur*

18 Stunden Lagerung bei	Serum	Serum
	nicht erhitzt	erhitzt (56°C/10 min.)
+20-22°C	160 E TNA/ml	160 E TNA/ml
-20°C	640 E TNA/ml	320 E TNA/ml

* DBA/2 Mäuse: $1,6 \times 10^7$ Keime. BCG i.p.; 9 Tage später 25 µg LPS i.v.. Serumgewinnung nach 2 Stunden.

** Abkürzungen: BCG: Bacillus Calmette-Guérin; LPS: Lipopolysaccharid; TNA: Tumor Nekrotisierende Aktivität

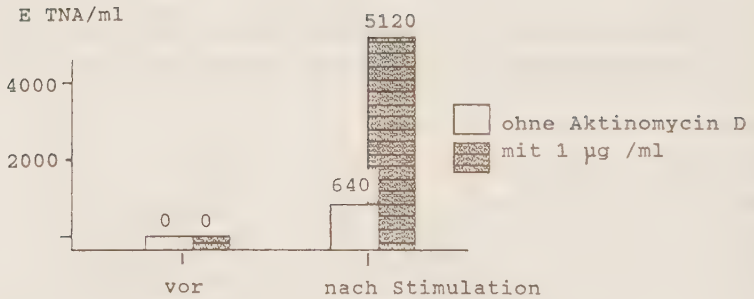


Abbildung 8:

Einfluß von Aktinomycin D auf die Wirksamkeit von Tumor Nekrose Serum im L929-Zytotoxizitäts-Test

Ein Kaninchen wurde stimuliert mit 8×10^7 Keimen BCG i.v., und 13 Tage später mit 125 µg LPS i.v.

Berechnung der Einheiten (E) TNA nach Titration auf L929 Zellen.

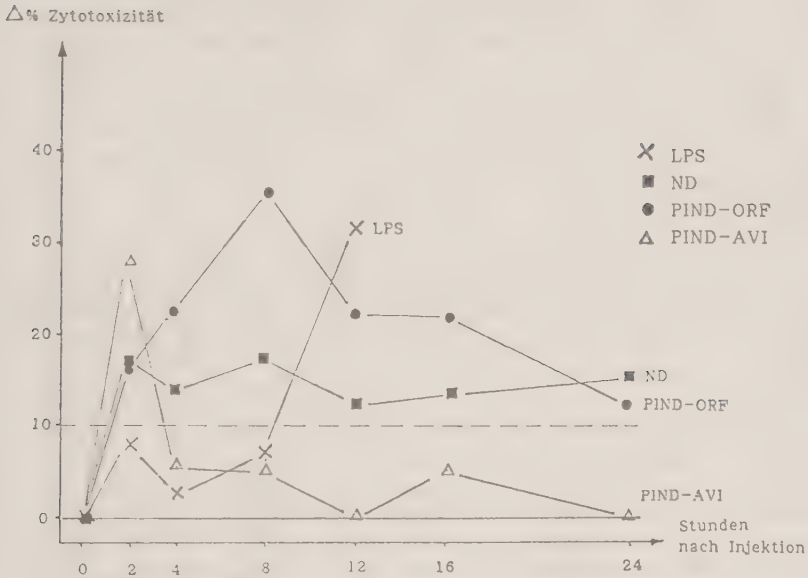


Abbildung 9:

In vitro: Steigerung der Zytotoxizität von Kaninchenserum durch Injektion von Immunstimulantien im L929-Zytotoxizitäts-Test

Je ein Kaninchen (weiblich, 2,5 kg) wurde mit New Castle Disease Virus (ND, 4 ml i.v.), PIND-AVI (Charge 141, 1 ml i.v.), PIND-ORF (Charge 041T, 1 ml i.v.), oder Lipopolysaccharid (LPS, 125 µg in 1 ml i.v.) am Tag 0 behandelt und Serum vorher und zu den angegebenen Zeiten nachher gewonnen. Das Serum wurde erhitzt (56°C, 10 min.). Es wurden Differenzen zwischen spontaner Zytotoxizität (vor Injektion) und nach Injektion gebildet.

Tabelle 5:

In vitro: Wirksamkeit von Kaninchenserum I** vor und nach
Injektion von Immunstimulatoren im L929-Zytotoxizitäts-Test

Kaninchen behandelt mit	Blutentnahme nach (Stunden)	Serum nicht erhitzt		Serum erhitzt (56°C/10 min.)	
		% Zytotoxizität bei Verd. 1:8	TNA E /ml	% Zytotoxizität bei Verd. 1:8	TNA E /ml
Cp/LPS*	vor Inj.	63,8	80	neg.*	0
Cp 3,5mg i.p.,	2	97,5	1280	34,2	<80
Tag -13					
LPS 125 µg i.v.,					
Tag 0					
BCG/LPS	vor Inj.	69,5	80	neg.	0
BCG 8x10 ⁷ i.v.,	2	96,9	10240	92,6	5120
Tag -13					
LPS 125 µg i.v.,					
Tag 0					
PIND-AVI	vor Inj.	4,8	<80	neg.	0
Charge 141	1	14,1	<80	neg.	0
2ml i.v.,	3	9,7	<80	neg.	0
Tag 0	6	24,0	<80	neg.	0
	24	42,2	<80	neg.	0
	48	14,7	<80	neg.	0
	72	25,2	<80	neg.	0
	216	78,6	80	neg.	0
PIND-ORF	vor Inj.	31,9	<80	neg.	0
Charge 0337	1	41,3	<80	neg.	0
2ml i.v.,	3	39,5	<80	neg.	0
Tag 0	6	60,1	80	neg.	0
	24	70,7	80	neg.	0
	48	36,6	<80	neg.	0
	72	42,9	<80	neg.	0
	216	49,0	<80	neg.	0

* Abkürzungen: neg.: negative Zytotoxizität; besseres Zellwachstum als in der Kontrolle; Cp: Corynebacterium parvum; BCG: Bacillus Calmette-Guérin; LPS: Lipopolysaccharid; TNA: Tumor Nekrotisierende Aktivität

** Aktinomyzin D Charge 16F-4017-2, Lagerung der Seren bei -20°C.

Tabelle 6:

*In vitro: Wirksamkeit von Kaninchenserum II** vor und nach Injektion von Immunstimulatoren im L929-Zytotoxizitäts-Test*

Kaninchen behandelt mit	Blutentnahme nach (Stunden)	Serum nicht erhitzt		Serum erhitzt (56°C/10 min.)	
		% Zytotoxizität bei Verd. 1:8	TNA E /ml	% Zytotoxizität bei Verd. 1:8	TNA E /ml
ND*	vor Inj.	41,0	<80	6,2	<80
4ml i.v.	2	53,2	80	23,7	<80
	4	75,2	80	20,5	<80
	8	59,8	80	24,1	<80
	12	79,7	80	18,3	<80
	16	60,3	80	20,8	<80
	24	52,5	80	21,7	<80
PIND-AVI	vor Inj.	71,8	80	17,8	<80
Charge 141	2	81,9	80	46,1	<80
1ml i.v.	4	78,6	80	23,5	<80
	8	65,4	80	23,3	<80
	12	85,2	80	5,7	<80
	16	62,8	80	23,3	<80
	24	79,9	80	neg.*	0
PIND-ORF	vor Inj.	75,6	80	17,8	<80
Charge 0417	2	88,5	320	33,8	<80
1ml i.v.	4	88,2	160	40,1	<80
	8	80,0	80	53,0	80
	12	80,1	80	40,6	<80
	16	80,6	160	41,8	<80
	24	86,7	80	29,7	<80
LPS	vor Inj.	81,3	160	5,6	<80
125µg	2	83,6	80	13,8	<80
in 1ml i.v.	4	91,9	160	9,5	<80
	8	91,9	320	13,2	<80
	12	98,8	160	36,9	<80

* Abkürzungen: neg.: negative Zytotoxizität; besseres Zellwachstum als in der Kontrolle; LPS: Lipopolysaccharid; ND: New Castle Disease-Virus; TNA: Tumor Nekrotisierende Aktivität

** Aktinomyzin D Charge 65F-40121, Lagerung des Serums zwei Wochen bei -80°C.

Tabelle 7:

*In vitro: Wirksamkeit von Seren von NMRI Mäusen** nach Injektion von Immunstimulatoren im L929-Zytotoxizitäts-Test*

Gruppe	Injektion			Blutentnahme nach (Std.)	Serum nicht erhitzt		Serum erhitzt (56°C/10 min.)	
	Dosis	Modus			% Zytotoxizität bei Verd. 1:8	TNA* E/ml	% Zytotoxizität bei Verd. 1:8	TNA E/ml
NaCl	0,2ml	i.p.	12		neg.*	0	neg.	0
PIND	0,2ml	i.p.	2		neg.	0	neg.	0
-AVI			4		neg.	0	neg.	0
Charge 141			8		7,4	<80	neg.	0
			12		neg.	0	neg.	0
			16		neg.	0	neg.	0
			20		neg.	0	neg.	0
			24		neg.	0	neg.	0
PIND	0,2ml	i.p.	2		neg.	0	neg.	0
-ORF			4		12,7	<80	6,5	<80
Charge 041T			8		neg.	0	neg.	0
			12		19,2	<80	neg.	0
			16		neg.	0	neg.	0
			20		neg.	0	neg.	0
			24		neg.	0	neg.	0
LPS*	50µg	i.p.	2		10,8	<80	neg.	0
	/0,4ml		4		55,3	80	17,5	<80
			8		33,4	<80	7,0	<80
Poly I:C 0,1mg		i.p.	24		neg.	0	neg.	0
ND*	0,4ml	i.p.	2		4,5	<80	neg.	0
			4		33	<80	neg.	0
			8		45,8	<80	neg.	0
			12		42,5	<80	2,2	<80
			16		11,2	<80	neg.	0
			20		neg.	0	neg.	0
			24		neg.	0	neg.	0

* Abkürzungen: neg.: negative Zytotoxizität: besseres Zellwachstum als in der Kontrolle; LPS: Lipopolysaccharid; ND: New Castle Disease-Virus; TNA: Tumor Nekrotisierende Aktivität

** Serum von je 3 weiblichen NMRI Mäusen wurde gepoolt

Tabelle 8:

*In vitro: Wirksamkeit von Seren von DBA/2** Mäusen nach
Injektion von Immunstimulatoren im L929-Zytotoxizitäts-Test*

Gruppe	Injektion			Blutentnahme nach (Std.)	Serum nicht erhitzt		Serum erhitzt (56°C/10 min.)	
	Dosis	Modus			% Zytotoxizität bei Verd. 1:8	TNA [*] E/ml	% Zytotoxizität bei Verd. 1:8	TNA E/ml
PBS*	0,5 ml	i.p.		8	neg. [*]	0	neg.	0
PIND-AVI Charge 141	0,2 ml	i.p.		8	neg.	0	neg.	0
PIND-ORF Charge 040T	0,2 ml	i.p.		8	neg.	0	neg.	0
LPS*	0,5 mg	i.p.		8	neg.	0	neg.	0
BCG/ LPS	1,6x10 ⁷ 25 µg	i.p. - 9 Tage/ i.v.		2	84,8	640	78,2	320
Poly I:C	0,1 mg	i.p.		22	neg.	0	neg.	0
HT-2 Toxin	90 µg 18 µg	i.p. i.p.		8 8	neg. neg.	0 0	neg. neg.	0 0
Ochra- toxin A	0,25mg 50 µg	i.p. i.p.		8 8	neg. neg.	0 0	neg. neg.	0 0

* Abkürzungen: neg. negative Zytotoxizität; besseres Zellwachstum als in der Kontrolle; PBS: Phosphate Buffered Saline; BCG: Bacillus Calmette-Guérin; LPS: Lipopolysaccharid; TNA: Tumor Nekrotisierende Aktivität

** Serum von je 3 weiblichen DBA/2 Mäusen wurde gepoolt

Tabelle 9:

*In vitro: Wirksamkeit von Kulturüberständen von Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) von NMRI Mäusen nach Zugabe von Immunstimulatoren im L929-Zytotoxizitäts-Test**

		% Zytotoxizität bei Verdünnung 1:8			
PEM-Kultur stimuliert mit	Dosis/ml PEM-Medium	Überstand abgehoben nach (Stunden)			
		1	3	6	22
NaCl pro inj.	0,1 ml	neg.**	neg.	neg.	neg.
PIND-AVI Charge 141	0,1 ml	neg.	neg.	7,2	1,9
PIND-ORF Charge 0301	0,1 ml	neg.	12,6	neg.	neg.
LPS**	1 µg	5,6	12,5	17,8	2,7
Poly I:C	10 µg	5,3	8,8	10,1	34,8
Cp**	0,1 mg	0,3	8,5	13,9	16,1

* 1,5x10⁶ PEM/ml wurden in 2,5 ml in 3,5 mm (Durchmesser) Kunststoff Zellkulturplatten eingesät, Immunstimulatoren in vitro zugegeben, je 0,5 ml Überstand zu den angegeben Zeiten abgehoben, durch ein 0,2 µm Filter passiert, bei -20°C gelagert und vor Zugabe zu L929-Zellen erhitzt (56°C, 10 min.).

** Abkürzungen: neg. negative Zytotoxizität; besseres Zellwachstum als in der Kontrolle; LPS: Lipopolysaccharid; Cp: *Corynebacterium parvum*

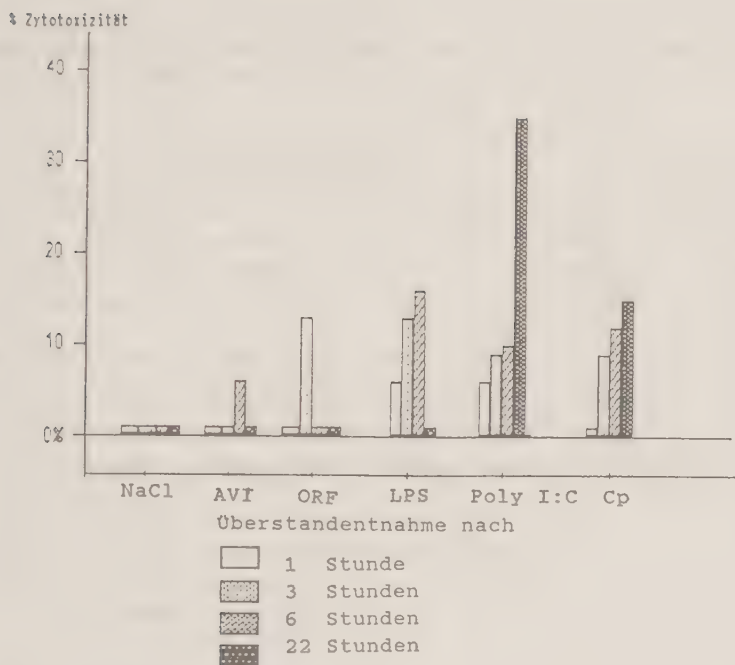


Abbildung 10:

In vitro: Wirksamkeit von Kulturüberständen von Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) von NMRI Mäusen nach Zugabe von Immunstimulantien im L929-Zytotoxizitäts-Test

$1,5 \times 10^6$ PEM/ml wurden zu je 2,5 ml in 3,5 mm (Durchmesser) Kunststoff Zellkulturplatten eingesät, jeweils NaCl (0,1 ml), PIND-AVI (Charge 141; 0,1 ml), PIND-ORF (Charge 030T; 0,1 ml), LPS (1 µg), Poly I:C (10 µg) oder Cp (0,1 mg) in vitro zugegeben und je 0,5 ml Überstand zu den angegebenen Zeiten abgehoben

Tabelle 10:

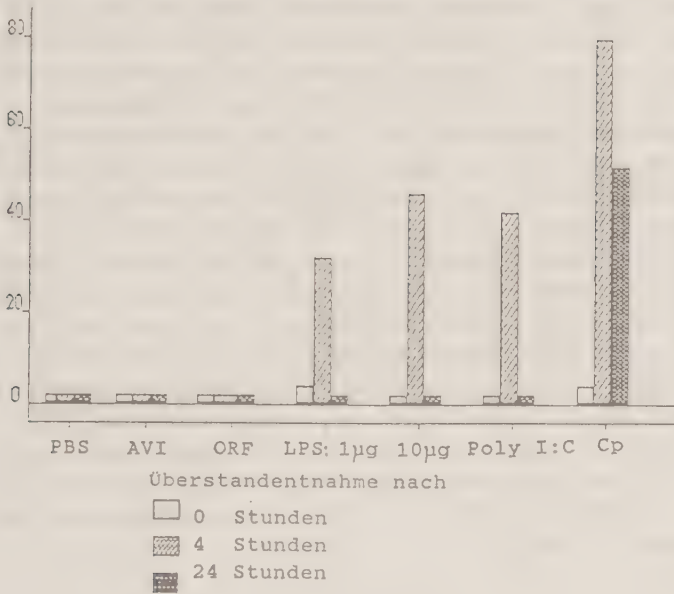
*In vitro: Wirksamkeit von Kulturüberständen von Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) von DBA/2 Mäusen nach Zugabe von Immunstimulatoren im L929-Zytotoxizitäts-Test**

Überstände vor Zugabe zu L929 Zellen		% Zytotoxizität bei Verdünnung von 1:8						
		nicht erhitzt			erhitzt (56°C, 10 min.)			
PEM Kultur stimuliert mit	Dosis/ml PEM-Medium	Überstand abgehoben nach (Stunden)						
		0	4	24	0	4	24	
PBS**	0,1 ml	neg.	**	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
PIND-AVI Charge 141	10,0 µl	neg.	neg.	neg.	3,8	neg.	neg.	neg.
PIND-ORF Charge 040T	10,0 µl	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
LPS**	1,0 µg	neg.	19,1	1,1	6,0	31,6	neg.	neg.
	10,0 µg	neg.	44,2	neg.	neg.	44,4	neg.	neg.
Poly I:C	20,0 µg	3,5	31,2	neg.	neg.	41,2	neg.	neg.
Cp** (E TNA /ml)	100,0 µg	neg.	79,5	63,7	3,7	80,9	51,9	neg.
			(320)	(80)		(320)	(80)	
HT-2 Toxin	4,1 ng	neg.	neg.	1,0	neg.	neg.	neg.	neg.
	0,8 ng	neg.	neg.	3,6	neg.	neg.	neg.	neg.
Ochratoxin A	10,0 µg	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	2,0 µg	neg.	neg.	3,2	neg.	neg.	neg.	neg.

* 1,29x10⁶ PEM/ml wurden in 2,25 ml in 3,5 mm (Durchmesser) Kunststoff Zellkulturplatten eingesät, jeweils Immunstimulatoren zugegeben, je 0,5 ml Überstand zu den angegebenen Zeiten abgehoben, durch ein 0,2 µm Filter passiert und bei -20°C gelagert.

** Abkürzungen: neg. negative Zytotoxizität: besseres Zellwachstum als in der Kontrolle; PBS: Phosphate Buffered Saline; LPS: Lipopolysaccharid; Cp: Corynebacterium parvum

% Zytotoxizität

**Abbildung 11:**

In vitro: Wirksamkeit von Kulturüberständen von Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) von DBA/2 Mäusen nach Zugabe von Immunstimulantien im L929-Zytotoxizitäts-Test

$1,29 \times 10^6$ PEM/ml wurden zu je 2,25 ml in 3,5 mm (Durchmesser) Kunststoff Zellkulturplatten eingesät, jeweils PBS (0,1 ml), PIND-AVI (Charge 141; 0,01 ml), PIND-ORF (Charge 040T; 0,01 ml), LPS (1 µg oder 10 µg), Poly I:C (20 µg) oder Cp (0,1mg) in vitro zugegeben, je 0,5 ml Überstand zu den angegebenen Zeiten abgehoben, durch ein 0,2 µm Filter passiert und bei -20°C gelagert.

3.2.1.2 Wirkungen auf Friend Erythroleukämie Zellklon F4-1

Abbildung 12 zeigt die Wachstumskurve von F4-1 Zellen *in vitro* nach Einsaat von 1×10^5 logarithmisch wachsenden Zellen /ml. An der Ordinate sind, der besseren Übersicht wegen, die Zellzahlen logarithmisch aufgetragen: Die Zellen wuchsen exponentiell und sie erreichten die lag-Phase etwa am 7. Tag der Inkubation bei einer Zelldichte von $1,5-2,5 \times 10^6$ Zellen /ml. Zusatz von DMSO (1,9%) oder von Buttersäure (0,5 M) verursachte ein langsames Wachstum der F4-1 Zellen und ein Erreichen der lag-Phase bei ca. 8×10^5 Zellen /ml. Der Anteil der Benzidin-positiven (B+) Zellen war bei Beginn der Inkubation stets unter 1%. Er stieg bei den DMSO Kontrollen ab dem 3. Tag und erreichte ein Maximum am 6. Tag mit ca. 60% B+. Bei Buttersäurezusatz stieg der Anteil B+ Zellen auf ca. 45%. Aus der Abbildung ist weiter ersichtlich, daß eine Zählung und Benzidinfärbung am Tag 2 und 6 die Unterschiede in den Wachstumskurven und im Anteil B+ Zellen am besten hervorhebt.

Die mikroskopische Untersuchung der nach Pappenheim gefärbten Präparate ergab polymorphe Zellen mit einem Kern : Plasma Größenverhältnis von $0,8 \pm 0,02$. Bei hämoglobinhaltigen Zellen waren kleinere Zellen mit kompaktem Kernchromatin auffällig. Das Kern- : Plasmaverhältnis betrug dann im Mittel $0,7 \pm 0,06$.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Seren und Überständen von adhäsiven Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) sind in den Abbildungen 13-17 dargestellt:

Es wurde bei den Abbildungen darauf verzichtet, die stets mitgeführte Positivkontrolle 0,5 M Buttersäure einzuzeichnen, denn die Werte waren wie in Abbildung 12. In jede Abbildung wurden 5-7 Graphen eingetragen, was aufgrund der geringen Unterschiede im Kurvenverlauf die optische Darstellung vereinheitlicht und es ermöglicht mit einem Blick alle Ergebnisse eines Versuches zu erfassen.

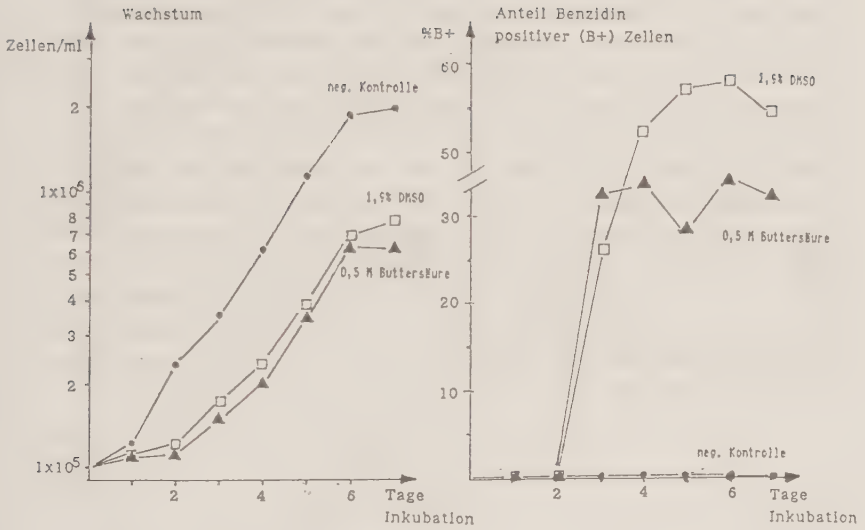


Abbildung 12:

Wachstum und Anteil hämoglobinhaltiger (Benzidin positiver) Friend Erythroleukämie Zellen

- neg. Kontrolle (Medium ohne Zusätze)
- 1,9% Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)
- ▲—▲ 0,5 M Buttersäure

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse nach Zugabe von 5% Seren von NMRI Mäusen. Es wurden die Seren verwendet, die auch im L929-Zytotoxizitäts-Test untersucht wurden (vergleiche Tabelle 7). Aus der Abbildung geht hervor, daß die Zellen der Kontrollen etwa wie die Standardkurve von Abbildung 10 wuchsen. DMSO stimulierte Zellen wuchsen langsamer und differenzierten sich zu 58,2% hämoglobinhaltigen Zellen. Die mit Serum behandelten Zellen vermehrten sich etwa wie die Negativkontrolle. Nach LPS Injektion (50 µg/ Maus i.p.) war das Serum, das nach 2 Stunden genommen wurde, deutlich wachstumshemmend für 6 Tage lang inkubierte F4-1 Zellen. Vier und acht Stunden nach LPS Injektion genommenene Seren hatten keine wachstumshemmende Wirkung mehr. Die Seren, die 8 und 12 Stunden nach Injektion von ND-Virus gewonnen wurden, hemmten ebenfalls zum Tag 6 der Inkubation das Wachstum von F4-1 Zellen, nicht jedoch, wenn das Serum 2 oder 24 Stunden nach ND Injektion genommen wurde. Es wurde in keiner Probe ein Anstieg der B+ Zellen beobachtet. Nicht abgebildet wurden folgende Ergebnisse: Nach Zugabe von Seren von Tieren, die mit PIND-AVI (0,2 ml; Charge 141) oder PIND-ORF (0,2 ml; Charge 041T) behandelt wurden, wuchsen die Zellen ebenso gut wie nach Zugabe von Seren nach NaCl-Injektion, d.h. es bestand keine Hemmung.

Legende zu Abbildung 13:

- Kontrolle: Negativ Kontrolle (Medium ohne Zusätze)
- DMSO: Positiv Kontrolle (Medium mit 1,9% DMSO)
- LPS 2: Serum mit Lipopolysaccharid (50 µg / 0,4ml
- LPS 4 i.p.) behandelte Tiere nach 2, 4 oder
- LPS 8 8 Stunden gewonnen
- △--△ ND 2: Serum mit Newcastle Disease Virus (0,4ml
- △—△ ND 8 i.p.) behandelte Tiere nach 2, 8 oder
- ▲--▲ ND 12 12 Stunden gewonnen
- NaCl: Serum mit NaCl-Lösung (0,9%, 0,2ml i.p.) behandelte Tiere

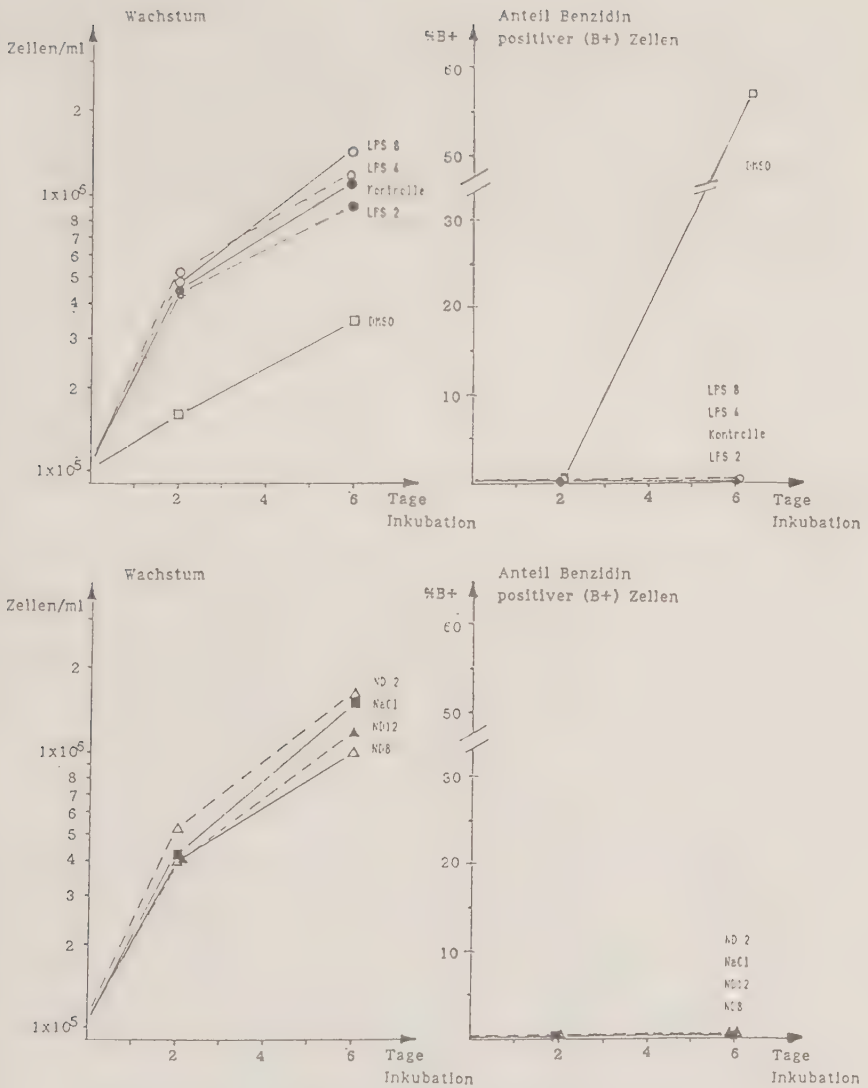


Abbildung 13:

Wachstum und Anteil hämoglobinhaltiger (Benzidin positiver) Friend Erythroleukämie Zellen nach Zugabe von 5% unerhitztem Serum von vorbehandelten NMRI Mäusen

Legende siehe gegenüberliegende Seite

Abbildung 14 zeigt die Wirkung von 5% Seren von DBA/2 Mäusen. Das Serum wurde gewonnen 8 Stunden nach Injektion der Inducer (nur BCG/LPS wurde nach 2 Stunden und Poly I:C nach 22 Stunden genommen). Weder Serum nach PIND-AVI Behandlung, noch Serum nach PIND-ORF, Poly I:C, PBS oder Mycotoxin Injektion führten zu einer Verlangsamung des Zellwachstums. Nur Serum von LPS und BCG/LPS behandelten Tieren hemmte am Tag 6 das F4-1 Zellwachstum. Das Serum von Poly I:C behandelten Tieren erhöhte den Anteil der B+ Zellen bis zum sechsten Inkubationstag auf 17,1% $\pm$ 0,6%.

Legende zu Abbildung 14:

- Kontrolle: Negativ Kontrolle (Medium ohne Zusätze)
- DMSO: Positiv Kontrolle (Medium mit 1,9% DMSO)
- △—△ AVI: Serum von PIND-AVI (Charge 141; 0,2ml i.p.) behandelten Tieren; 8 Stunden p. inj.
- ▲—▲ ORF: Serum von PIND-ORF (Charge 040T; 0,2ml i.p.) behandelten Tieren; 8 Stunden p. inj.
- LPS: Seren von Lipopolysaccharid (LPS, 0,5mg i.p.) behandelten Tieren; 8 Stunden p. inj.
- BCG/LPS: Serum von BCG/LPS ($1,6 \times 10^7$ BCG i.p. Tag -9/25µg LPS i.v. Tag 0) behandelten Tieren; 2 Stunden p. inj.
- Poly I:C: Serum von Poly I:C (0,1mg i.p.) behandelten Tieren; 22 Stunden p. inj.
- PBS: Serum von PBS (0,5ml i.p.) behandelten Tieren; 8 Stunden p. inj.
- △---△ HT-2 (18): Serum von HT-2 Toxin (18µg i.p.) behandelten Tieren; 8 Stunden p. inj.
- ▲---▲ HT-2 (90): Serum von HT-2 Toxin (90µg i.p.) behandelten Tieren; 8 Stunden p. inj.
- OA (50): Serum von Ochratoxin A (50µg i.p.) behandelten Tieren; 8 Stunden p. inj.
- OA (250): Serum von Ochratoxin A (250µg i.p.) behandelten Tieren; 8 Stunden p. inj.

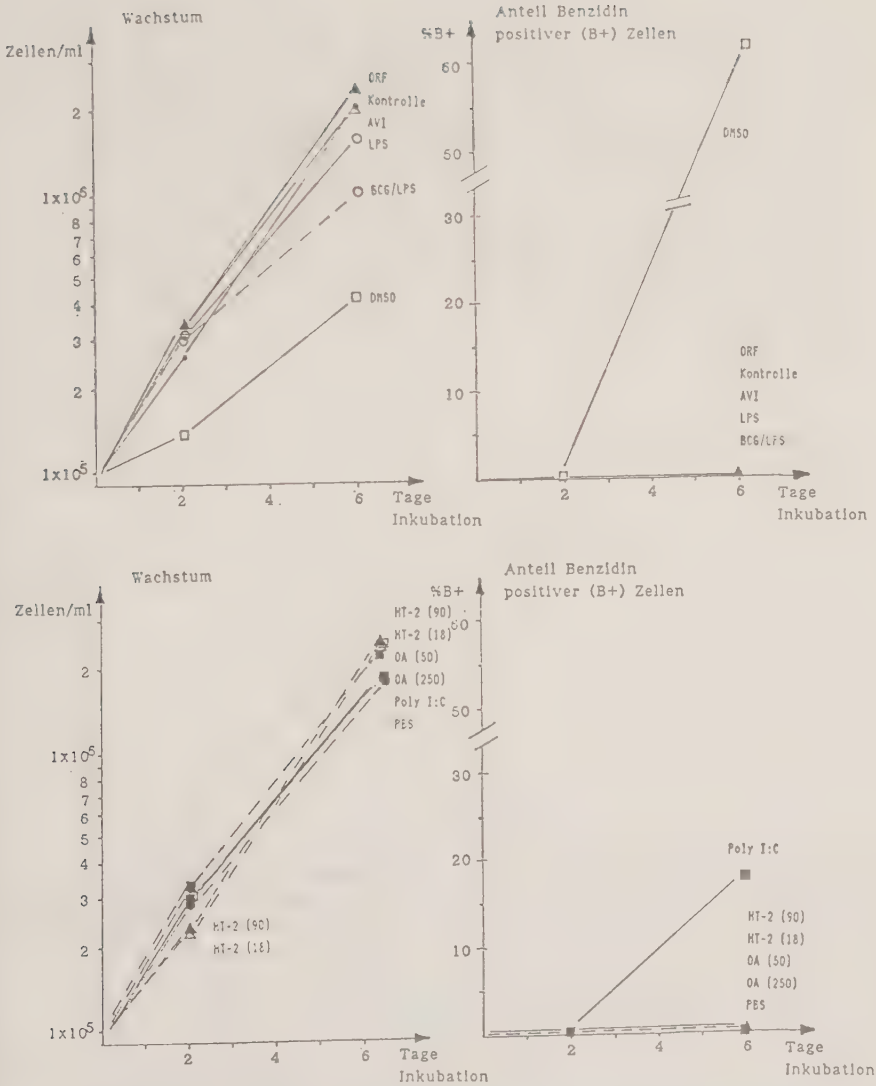


Abbildung 14:

Wachstum und Anteil hämoglobinhaltiger (Benzidin positiver) Friend Erythroleukämie Zellen nach Zugabe von 5% unerhitztem Serum von vorbehandelten DBA/2 Mäusen

Legende siehe gegenüberliegende Seite

Die Abbildungen 15-17 zeigen die Wirkung der Überstände von PEM Kulturen von DBA/2 Mäusen. Die Überstände wurden nach 0 Std. (Abbildung 15), 4 Std. (Abbildung 16) und nach 24 Std. (Abbildung 17) genommen. Nach unmittelbarer Überstandentnahme (0 Std.) erwies sich Poly I:C für F4-1 Zellen bei 2 Tagen Inkubation hemmend. Ochratoxin A (Dosis 2,0 µg/ml PEM Medium) hemmte das Wachstum innerhalb 6 Tagen deutlich. 4 Stunden nach Zugabe von LPS (1,0 µg/ml) zu PEM Kulturen war der Überstand dann wachstumshemmend auf F4-1 Zellen (Abbildung 16) am 2. Inkubationstag. PEM Kulturen, die 24 Std. mit Immunstimulantien inkubiert wurden, hatten keine wachstumshemmende Wirkung auf F4-1 Zellen.

Legende zu den Abbildungen 15-17:

- Kontrolle: Negativ Kontrolle (Medium ohne Zusätze)
- DMSO: Positiv Kontrolle (Medium mit 1,9% DMSO)
- △——△ AVI: Überstand nach PIND-AVI Zugabe (Ch. 141; 10,0 µl/ml)
- ▲——▲ ORF: Überstand nach PIND-ORF Zugabe (Ch. 040T; 10,0 µl/ml)
- LPS (1) Überstand nach LPS Zugabe (1,0 µg/ml)
- LPS (10) Überstand nach LPS Zugabe (10,0 µg/ml)
- Poly I:C: Überstand nach Poly I:C Zugabe (20,0 µg/ml)
- PBS: Überstand nach PBS Zugabe (0,1 ml/ml)
- ×——× Cp: Überstand nach *C. parvum* Zugabe (0,1 mg/ml)
- △——△ HT-2 (1): Überstand nach HT-2 Toxin Zugabe (0,8 ng/ml)
- ▲——▲ HT-2 (5): Überstand nach HT-2 Toxin Zugabe (4,1 ng/ml)
- OA (1): Überstand nach Ochratoxin A Zugabe (2,0 µg/ml)
- OA (5): Überstand nach Ochratoxin A Zugabe (10,0 µg/ml)

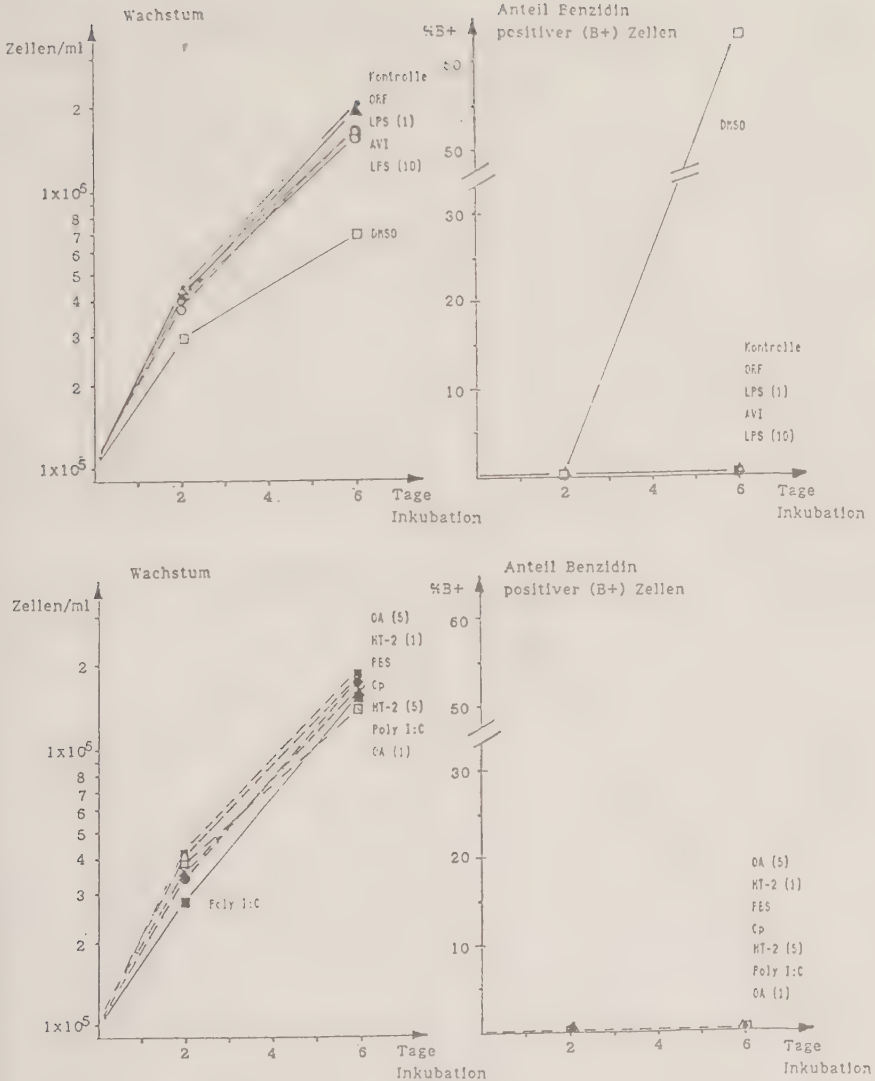


Abbildung 15:

Wachstum und Anteil hämoglobinhaltiger (Benzidin positiver) Friend Erythroleukämie Zellen nach Zugabe von 5% unerhitztem Überstand von adhäsiven Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) von DBA/2 Mäusen nach Zugabe von Immunstimulantien
Überstandentnahme nach 0 Stunden

siehe Legende zu den Abbildungen 15-17

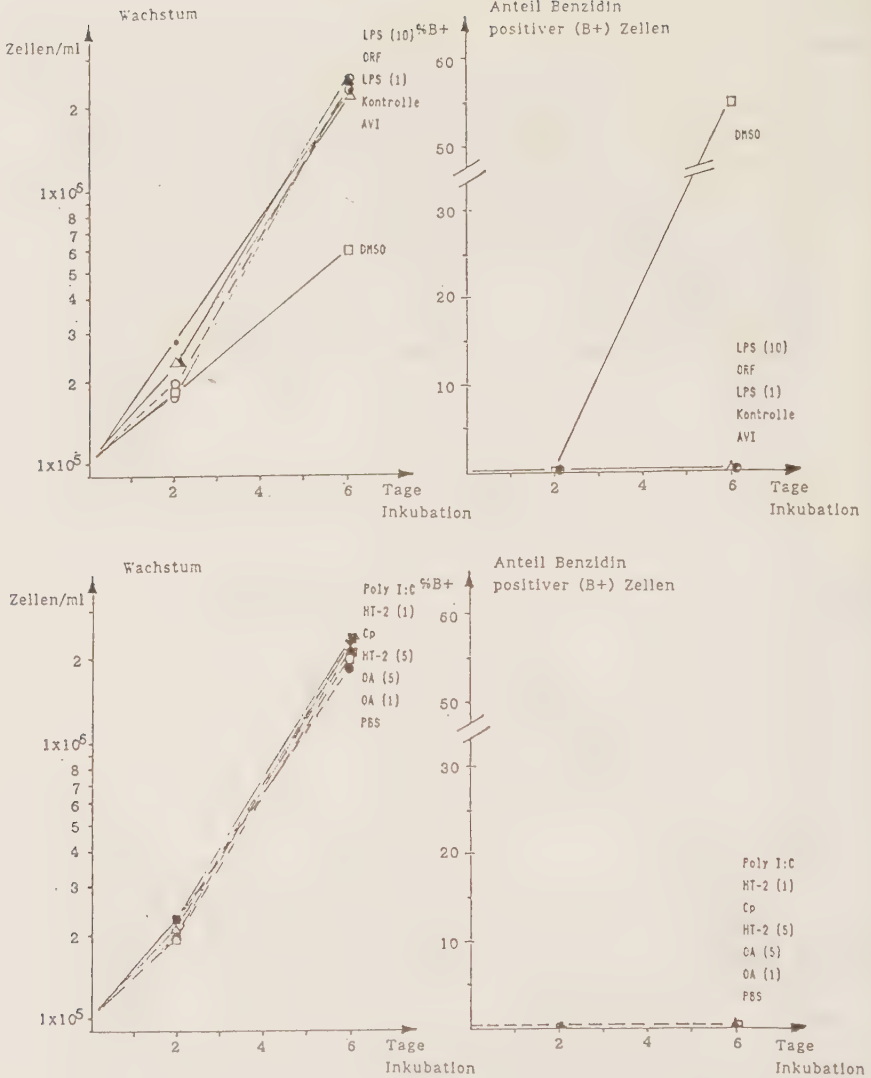


Abbildung 16:

Wachstum und Anteil hämoglobinhaltiger (Benzidin positiver) Friend Erythroleukämie Zellen nach Zugabe von 5% unerhitztem Überstand von adhäsiven Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) von DBA/2 Mäusen nach Zugabe von Immunstimulantien
Überstandentnahme nach 4 Stunden

siehe Legende zu den Abbildungen 15-17

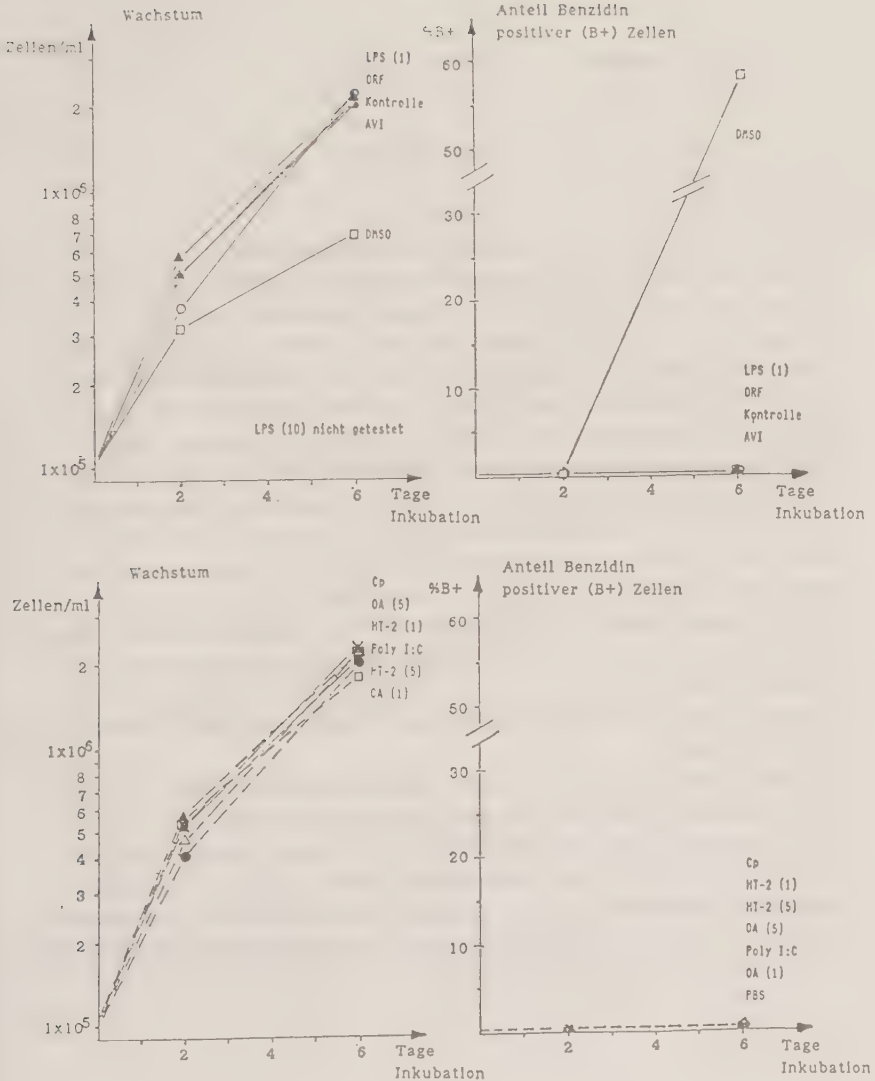


Abbildung 17:

Wachstum und Anteil hämoglobinhaltiger (Benzidin positiver) Friend Erythroleukämie Zellen nach Zugabe von 5% unerhitztem Überstand von adhäsiven Peritoneal-Exsudat mononukleären Zellen (PEM) von DBA/2 Mäusen nach Zugabe von Immunstimulantien
Überstandentnahme nach 24 Stunden

siehe Legende zu den Abbildungen 15-17

3.2.2 *In vivo* Versuche

3.2.2.1 Versuche mit Ehrlich Aszites Karzinom

In den Vorversuchen konnte folgendes festgestellt werden:

a) Die intraperitoneale Applikation von Ehrlich Aszites Karzinom führte zu sehr konstantem Auftreten der folgenden Erscheinungen:

(1) Das Gewicht der Mäuse blieb bis zum Auftreten von Aszites konstant, nahm dann aber erheblich zu. Der Gewichtszunahmefaktor stieg daher erst bei Aszitesanbildung um $\geq 1,15$ (15%) (siehe *Abbildung 18*).

(2) Der Abdomenumfang läßt sich gut abschätzen, sodaß eine Gewichtszunahme zusammen mit einer Abdomenzunahme als sicheres Zeichen für das Auftreten von Aszites gelten konnte. Es ließ sich bei stichprobenartig entnommenen Mäusen, die Aszites und einen Gewichtszunahmefaktor von ca. 1,15 hatten, stets tumorzellhaltiges Punktat gewinnen (ca. 3-8 ml Punktat mit 10^7 Zellen /ml).

(3) Der Tag des ersten Auftretens von Aszites (Aszitesanbildung) steht in Abhängigkeit zur inokulierten Zellzahl (Korrelationsfaktor -0,93; Regression -0,63).

(4) Spontanremissionen traten bei niedrigen Dosierungen auf, waren aber insgesamt selten.

(5) Das Aszitesvolumen, das durch Peritonealpunktion 8 bis 10 Tage nach Inokulation von 5×10^6 - 1×10^7 Zellen gewonnen wurde betrug 4-17 ml mit 1×10^7 - 1×10^8 vitalen Zellen /ml Punktat und 2-15% toten Zellen. Es ließ sich keine Abhängigkeit finden zwischen inokulierter Zelldosis, gewonnenem Punktatvolumen, Anzahl lebender Zellen /ml Punktat, prozentualem Anteil toter Zellen und Dauer des bestehenden Aszites (Daten hierzu nicht aufgelistet).

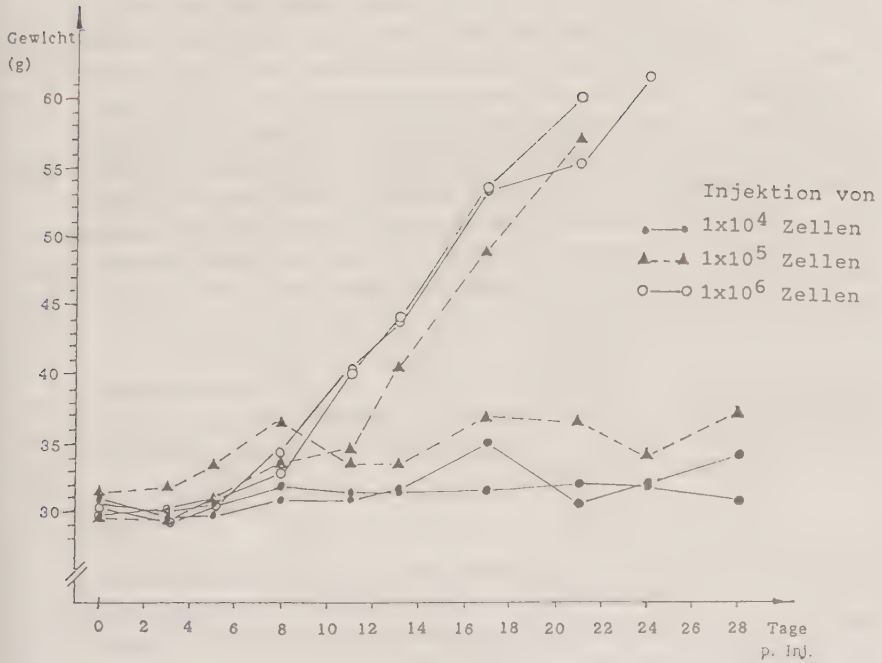


Abbildung 18:

Gewicht von sechs NMRI Mäusen nach Inokulation von Ehrlich Aszites Karzinom Zellen i.p.

b) Die subkutane Injektion von Ehrlich Aszites Karzinom führte bei den Tieren, die mehr als 1×10^5 Zellen erhielten zu einer Schwellung ab dem 3. Tag p. inj.. Doch wurde der tastbare Knoten erst bei Tieren mit $\geq 1 \times 10^7$ inokulierten Zellen meßbar (Tag 13: mittlerer Durchmesser $5,8 \text{ mm} \pm 3,6 \text{ mm}$). Der Knoten bildete sich aber dann bei allen Tieren (bis auf eine Maus nach Inokulation von 5×10^7 Zellen) zurück und war am 46. Tag nicht mehr nachweisbar. Nach 103 Tagen wurden alle Tiere getötet und pathologisch-anatomisch untersucht. Es ließen sich weder lokale Veränderungen, noch Anzeichen einer Metastasierung finden. Die Maus, bei der sich der Knoten nicht zurückbildete (Durchmesser am Tag 103: $4 \times 5 \times 14 \text{ mm}$) wurde auch histologisch untersucht, wobei subkutan Karzinomzellen nachgewiesen wurden. Die weiteren Organe waren ohne besonderen Befund. Die subkutane Injektion scheint somit nur mit äußerst hohen Zelldosen zu bleibenden Tumoren zu führen und erfüllt durch die hohe Remissionsrate bei unbehandelten Tieren nicht die Voraussetzungen für ein gutes Tumormodell.

c) Die intramuskuläre Injektion führte nur in einem Fall nach intraglutaealer Injektion zu einem tastbaren Knoten, der sukzessive zur Lähmung der Gliedmaße führte (Tag 20). Auch hier sind die Voraussetzungen für ein gutes Tumormodell nicht erfüllt.

Die hohe Remissionsrate bei der soliden Form des Ehrlich Aszites Karzinoms, sowie die Beobachtung, daß Tiere nach ausgeheiltem Aszites bei einer zweiten Injektion weniger häufig an Aszites erkrankten (Daten nicht aufgeführt), ließen die Vermutung zu, der verwendete Ehrlich Aszites Stamm sei immunogen. Die Ergebnisse in *Tabelle 11* zeigen, daß eine ein- oder zweimalige Vakzinierung mit Y-bestrahlten, nicht vermehrungsfähigen, lebenden Zellen zu einer deutlichen Verringerung der Mortalität (60%) führte. Im Vergleich dazu war die Mortalität bei Tieren nach Injektion von 5×10^6 unbestrahlten Zellen 100%.

Tabelle 11:

In vivo: Ergebnisse der ein- oder zweimaligen Vakzinierung von NMRI Mäusen (33-37g) mit γ -bestrahlten Ehrlich Aszites Karzinom Zellen und anschließender Belastung mit unbestrahlten Zellen (challenge)

Gruppe	Injektionstag (Zellzahl)			Mortalität bei/von Tieren	%
	Tag 0 (1×10^7)	Tag 29 (1×10^7)	Tag 53 (5×10^6)		
2 mal Vakz.	γ -Vakz.	γ -Vakz.	challenge	6/10	60%
1 mal Vakz.	NaCl	γ -Vakz.	challenge	3/5	60%
Kontrolle 0	challenge	-	-	5/5	100%
Kontrolle 29	NaCl	challenge	-	5/5	100%
Kontrolle 53	NaCl	NaCl	challenge	5/5	100%

Die Versuche zur Suppression von Aszites durch Immunstimulantien hatten folgende Ergebnisse:

(1) Im Versuch mit 5×10^5 Zellen i.p. wurde die Tumorzelldosis so niedrig gehalten, daß bei der Placebogruppe nur 3 von 6 Tieren an Aszites erkrankten und starben (siehe *Tabelle 12*). Die dreifache Vorbehandlung der Mäuse mit den beiden Paramunitätsinducern PIND konnte weder die Aszitesentstehung, die Mortalität, noch ein verzögertes Auftreten der Erkrankung verhindern. *Corynebacterium parvum* (Cp) erwies sich in den beiden Gruppen geringgradig günstiger auf die Beurteilungskriterien als das Placebo.

(2) Beim Versuch mit 6×10^5 Zellen i.p. lag der Anteil der erkrankten Tiere in der Placebogruppe bei 66% (siehe *Tabelle 13*). Eine einmalige Behandlung mit Prednisolon (15,6 mg /kg) führte zu keiner Erhöhung des Anteils der erkrankten Tiere. Die i.m. Injektion von PIND-AVI zeigte keine wesentlichen Unterschiede zur Placebogruppe, doch 0,3 ml PIND-AVI i.p. erhöhte die mittlere Überlebenszeit und senkte bei Applikation am Tag 0 die Mortalität deutlich. PIND-ORF verlängerte auch meist die Überlebenszeit und verzögerte die Aszitesentstehung. Cp senkte deutlich die Mortalität und BCG erhöhte die Überlebenszeit um 7 Tage. Nach s.c. Applikation von BCG kam es zu erheblichen Schwellungen am Injektionsort.

(3) Im Versuch mit $8,8 \times 10^5$ Zellen i.p. (siehe *Tabelle 14*) erkrankten 95% der mit Placebo behandelten Tiere und nur in den Gruppen PIND-AVI (Tag 0,+6) und Cp (Tag -1) wurde die Mortalität verringert (Signifikant für Cp: $p=0,005$ im Chi-Quadrat Test).

Tabelle 12:

*In vivo: Wirksamkeit von PIND-AVI, PIND-ORF und Cp***
gegenüber 5×10^5 i.p. inokulierten Ehrlich Aszites Karzinom
Zellen der NMRI Maus (20-25g)*

Gruppe	Applikation			Aszitesentstehung			Mortalität		
	Dosis*	Modus	Tag**	bei/von	Tag n	$\pm$ s	bei/von	Tag n	$\pm$ s
NaCl	0,3 ml	i.p.	-3;-2;-1;	3/6	12,0	0,0	3/6	28,0	3,5
PIND-AVI									
Ch. 141	0,3 ml	i.p.	-3;-2;-1;	4/6	16,0	7,0	4/6	28,8	7,0
PIND-ORF									
Ch. 0807	0,3 ml	i.p.	-3;-2;-1;	6/6	15,0	2,6	6/6	26,8	4,3
Cp	0,25 mg	i.p.	-2	2/6	22,0	14,0	2/6	17,0	10,0
	0,25 mg	i.p.	0	2/6	12,0	0,0	2/6	27,0	4,2

* die Dosis wurde bei allen Tieren in einem Volumen von 0,3 ml mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung injiziert

** Tag 0 ist der Tag der Tumorinokulation

*** Abkürzung: Cp: Corynebacterium parvum

Tabelle 13:

*In vivo: Wirksamkeit von PIND-AVI, PIND-ORF, Cp***, BCG und Prednisolon gegenüber 6×10^5 i.p. inokulierten Ehrlich Aszites Karzinom Zellen der NMRI Maus (22-26g)*

Gruppe	Applikation				Aszitesentstehung			Mortalität		
	Dosis*	Modus	Tag**		bei/von	Tag n	$\pm s$	bei/von	Tag n	$\pm s$
NaCl	0,3 ml	s.p.	-2		4/6	10,0	4,0	4/6	21,5	5,0
Predni- solon	0,375 mg	i.m.	0		4/6	10,5	3,8	4/6	24,3	3,9
PIND-AVI Charge 141	0,3 ml	i.p.	-2		4/6	14,5	3,0	4/6	25,0	5,0
			-1		6/6	14,0	1,6	6/6	23,8	3,1
			0		0/6	--	--	0/6	--	--
		i.m.	-2		4/6	13,7	6,0	4/6	24,3	3,9
			-1		4/6	10,5	3,8	4/6	22,0	2,2
			0		5/6	13,0	2,1	5/6	24,0	1,2
PIND-ORF Charge 030T	0,3 ml	i.p.	-2		5/6	15,0	3,1	5/5	21,8	4,1
			-1		6/6	18,2	8,4	6/6	30,3	10,4
			0		4/6	19,0	6,0	4/6	31,8	6,7
		i.m.	-2		4/6	17,3	5,1	4/6	27,5	4,4
			-1		5/6	11,2	1,6	5/5	21,4	3,3
			0		6/6	15,0	1,5	6/6	26,2	1,8
Cp***	0,25 mg	i.p.	-2		1/6	30	--	1/6	78	--
			0		2/6	11,5	2,1	2/6	20,0	5,7
BCG***	$4,1 \times 10^6$	i.p.	0		5/6	13,8	4,3	5/6	28,4	2,9
		s.c. ¹⁾	0		5/6	10,6	3,7	5/6	22,4	4,0

* die Dosis wurde bei allen Tieren in einem Volumen von 0,3 ml mit 0,9 %iger NaCl-Lösung injiziert

** Tag 0 ist der Tag der Tumorinokulation

*** Abkürzungen: Cp: *Corynebacterium parvum*; BCG: *Bacillus Calmette-Guérin*

1) erhebliche s.c. Schwellungen bis zum Tag 3

Tabelle 14:

In vivo: Wirksamkeit von PIND-AVI, PIND-ORF, Cp^{***}, BCG, Omnadin^R, Poly I:C und Prednisolon gegenüber $8,8 \times 10^5$ i.p. inokulierten Ehrlich Aszites Karzinom Zellen der NMRI Maus (22-27g)

Applikation				Aszitesentstehung				Mortalität			
Gruppe	Dosis*	Modus	Tag**	bei/von	%	Tag	n ± s	bei/von	%	Tag	n ± s
NaCl	0,3 ml i.p.		0	38/40	95,0	9,6	2,3	38/40	95,0	22,1	4,8
Predni- solon	1,73 mg i.p.-1;0;+4			35/39	89,7	11,1	2,6	35/39	89,7	24,3	7,5
PIND-AVI	0,3 ml i.p.		-1	34/38	89,5	10,9	2,3	34/38	89,5	22,8	3,0
Charge 141			0	37/40	92,5	9,5	2,3	37/40	92,5	20,5	4,9
			0;+6	33/39	84,6	9,7	2,0	33/39	84,6	20,4	4,1
PIND-ORF	0,3 ml i.p.		0	38/40	95,0	10,3	2,5	38/40	95,0	21,7	4,3
Charge G301			0;+6	38/40	95,0	9,3	2,9	38/40	95,0	20,7	3,5
Cp ^{***}	0,25 mg i.p.		-1	16/40	40,0	12,2	4,9	16/40	40,0	21,9	3,4
BCG ^{***}	$6,2 \times 10^5$ i.p.		0	36/40	90,0	9,7	2,1	36/40	90,0	20,7	4,7
Omnadin ^R	0,092 ml i.p.		0	35/39	89,7	11,6	2,5	35/39	89,7	21,2	3,3
Poly I:C	0,1 mg i.p.		0	39/40	97,5	9,4	1,5	39/40	97,5	20,4	2,9

* die Dosis wurde bei allen Tieren in einem Volumen von 0,3 ml mit 0,9%-iger NaCl-Lösung injiziert

** Tag 0 ist der Tag der Tumorkonkulation

***Abkürzungen: Cp: *Corynebacterium parvum*; BCG: *Bacillus Calmette-Guérin*

3.2.2.2 Versuche mit Friend Erythroleukämie

Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Mäusen bezüglich Tumoranbildung bestanden nicht.

a) Subkutane Applikation von *in vivo* und *in vitro* passagierten Zellen (10^5 - 10^7) führte regelmäßig zu folgenden Erscheinungen:

klinisch: Nach Knotenbildung an der Injektionsstelle (dorsal im Lendenwirbelbereich) in ca. 2-3 Wochen p.i. kam es ab dem 30. bis zum 70. Tag innerhalb eines Tages zur Paralyse der Hintergliedmaßen und des Schwanzes.

makroskopisch-anatomisch: Nach anfänglichem Primärtumor an der Injektionsstelle, der nach 60-70 Tagen fast vollständig abheilte, ließen sich Tumoren in den regionären Lymphknoten (Ln. inguinales superficiales, Ln. axillares), Milz, Leber und im Knochenmark finden.

histologisch-anatomisch: Die Untersuchung ergab am Inokulationsort und in den makroskopisch veränderten Organen erhebliche leukotische Tumorzellinfiltrate mit weitgehender Zerstörung der Organstruktur. Die von den Wirbelknochen ausgehende Infiltration in die umgebende Muskulatur und in den Epiduralraum verursachte die Paralysen der Hintergliedmaßen. Es ließen sich in den Blutgefäßen sämtlicher Organe Tumorzellen finden. Es ist allerdings nicht geklärt, ob es sich bei diesen Tumorzellen um Metastasen handelt. *In vivo* Transfer von F4-1 Zellen kann möglicherweise zur Virusfreisetzung des replikationsdefekten SFV führen, da in DBA/2 Mäusen endogene Viren vorhanden sind, die die SFV Komponente des Friendvirus verbreiten (Ostertag, persönliche Mitteilung).

b) Intraperitoneale Injektion (1×10^5 bis 5×10^5 Zellen) führte zu Milz- und Lebertumoren mit z.T. erheblichen Organvergrößerungen, aber nicht zu Aszites. Die Bauchhöhlenlymphknoten waren z.T. vergrößert. Durch Peritoneallavage mit sterilem E-MEM ließen sich vitale Tumorzellen gewinnen, die *in vitro* und *in vivo* wieder passagierbar waren.

Die Auswertung vom Versuch mit 1×10^3 F4-1 Zellen i.p. zeigte, daß keinerlei Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren bestanden. Wie *Tabelle 15* zeigt, sind in diesem Versuch bei der Kontrollgruppe (NaCl Injektion) 81,1% der Tiere im Beobachtungszeitraum gestorben. Bei den anderen Gruppen war die Mortalität höher, außer in der Gruppe nach BCG Injektion (75%). Der mittlere Todestag war nur bei den Gruppen nach Cp und nach BCG Injektion höher (BCG signifikant: $p=0,05$ im Wilcoxon Rangsummen-Test), d.h. BCG und Cp waren als einzige Inducer in diesem Versuch in der Lage, die Überlebenszeit zu erhöhen. Die Sektion der gestorbenen Tiere ergab stets eine, mit Tumorknoten durchsetzte, stark vergrößerte Milz und zum Teil Hepatomegalie, ebenfalls mit Tumorknoten. Die überlebenden Tiere, die am Tag 105 untersucht wurden, hatten keine Anzeichen einer Erkrankung.

Tabelle 15:

*In vivo: Wirksamkeit von PIND-AVI, PIND-ORF, Cp***, BCG, Poly I:C und NaCl-Lösung gegen 1×10^3 i.p. inokulierten Friend Erythroleukämie Zellen (F4-1) bei DBA/2 Mäusen (weiblich, 20-25g, männlich, 20-26g)*

Gruppe	Applikation i.p. Dosis Tag	Mortalität [†]			
		bei/von	%	Tag n	±s
NaCl	0,2ml -2;0	9/11	81,1	55,9	17,8
PIND-AVI 0,2ml	0,2ml -2;0	12/12	100,0	52,7	10,4
PIND-ORF 0,2ml	0,2ml -2;0	12/12	100,0	60,5	11,1
Cp***	0,25mg -2;- ^{**}	11/12	91,7	76,0	21,1
BCG***	0,13mg -2;- ^{**}	9/12	75,0	77,4	16,0
Poly I:C	0,1mg -2;- ^{**}	12/12	100,0	62,7	12,8

[†] Der Versuch wurde am Tag 105 beendet.

^{**} Am Tag 0 wurden bei den Gruppen Cp, BCG und Poly I:C nur 0,2 ml NaCl-Lösung injiziert.

^{***} Abkürzungen: Cp: *Corynebacterium parvum*; BCG: *Ecillus Calmette-Guérin*

3.2.2.3 Versuch mit Methylcholanthren

Die Kontrollgruppen, die nur Trioctanoin und die Behandlung erhielten, nicht aber Methylcholanthren (MCA), hatten nur in den ersten drei Wochen leichte Schwellungen an der Injektionsstelle des Öls. Die Ergebnisse der Versuchsgruppen mit MCA sind in *Tabelle 16* und in den *Abbildungen 19-22* zusammengestellt: Die Tumoren bildeten sich bei allen Gruppen etwa gleichmäßig schnell an (mittlerer Tumorangang am Tag 94; siehe *Abbildungen 19,20*). Nur nach Injektion von PIND-ORF i.l. und nach NaCl i.l. Injektion bildeten sich die Tumoren schon nach 74-78 Tagen an. Im Beobachtungszeitraum (126 Tage) starben 5/9 der Gruppe NaCl i.l., während PIND-AVI oder PIND-ORF behandelte Tiere nur zu 1/10 starben.

Die Volumenentwicklung der Tumoren zeigen die *Abbildungen 21,22*: Der Mittelwert aus einzelnen Tumorumfängen ergab, im Koordinatensystem gegen die Zeitachse aufgetragen, keine steigende Kurve, sondern unübersichtliche Schwankungen mit großen Standardabweichungen, da neben den länger bestehenden, großen Tumoren kleine, neu aufgetretene Tumoren ebenfalls berücksichtigt wurden. Deshalb wurde die Summe der einzelnen Tumorumfängen abgebildet:

Nach i.p. Applikation von Inducern oder Placebo ist nach Placebo die Steigung der Kurve etwas geringer, die Kurven verlaufen ab Tag 99 annähernd parallel, d.h. die Tumoren wuchsen etwa gleich schnell. Jedoch wuchsen bei i.l. Applikation von Placebo die Tumoren deutlich schneller als nach Behandlung mit Inducern, wenngleich auch hier die Gesamttumormasse nach 99 Tagen etwa gleich war.

Die makroskopisch-pathologische Untersuchung ergab bei einigen Mäusen Schwellungen der regionalen Lymphknoten, doch in keinem Fall Anzeichen einer Metastasenbildung in andere Organe.

% Tumorangang

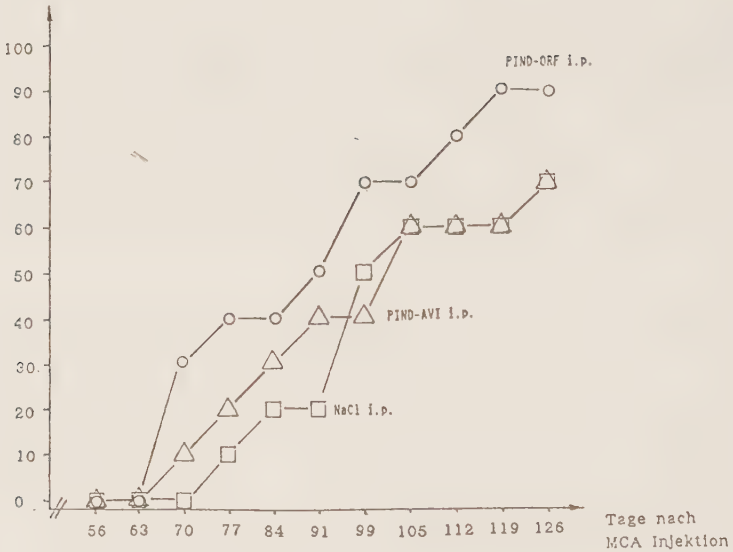


Abbildung 19:

Ausbildung von Tumoren (Tumorangang) nach s.c. Injektion von Methylcholanthren (MCA) in NMRI Mäusen

Injektion von

- NaCl i.p. (10 Tiere)
- △ PIND-AVI i.p. (10 Tiere)
- PIND-ORF i.p. (10 Tiere)

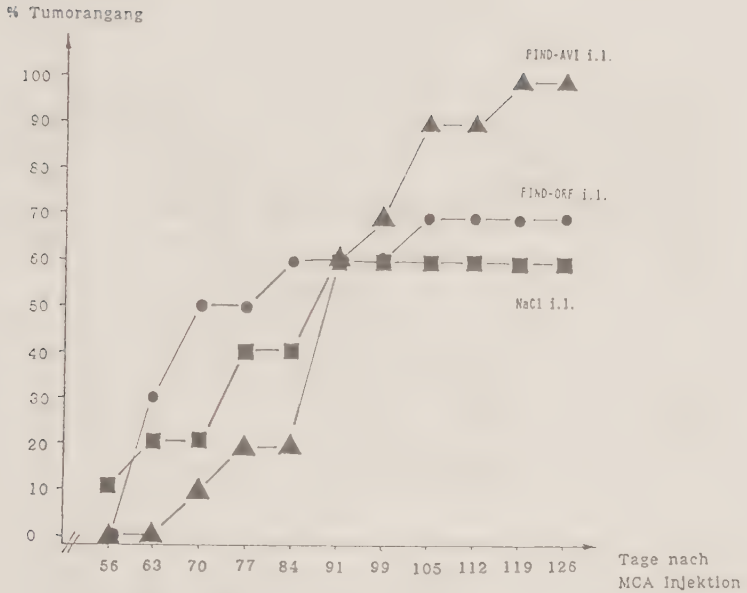


Abbildung 20:

Ausbildung von Tumoren (Tumorangang) nach s.c. Injektion von Methylcholanthren (MCA) in NMRI Mäusen

Injektion von

- NaCl i.l. (9 Tiere)
- ▲ PIND-AVI i.l. (10 Tiere)
- PIND-ORF i.l. (10 Tiere)

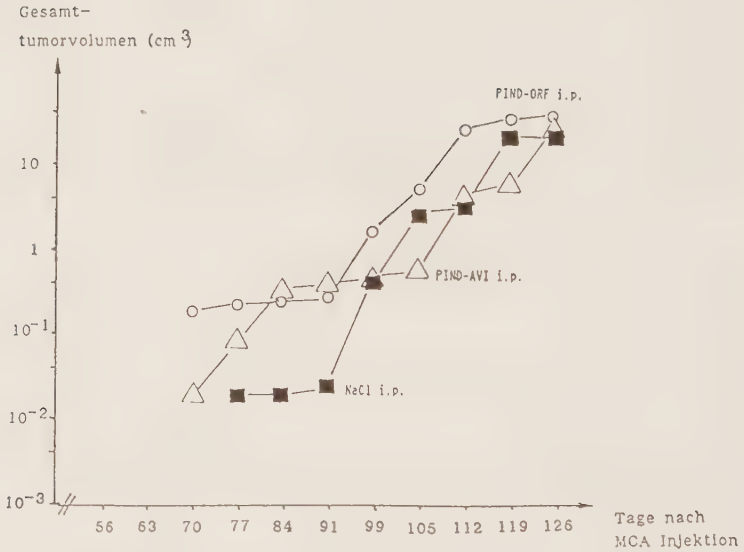


Abbildung 21:

Volumenzuwachs von Tumoren nach s.c. Injektion von Methylcholanthren (MCA) in NMRI Mäusen

Die Tumorigen der einzelnen Tiere wurden addiert zum Gesamtumorigen.

Injektion von

- NaCl i.p. (10 Tiere)
- △ PIND-AVI i.p. (10 Tiere)
- PIND-ORF i.p. (10 Tiere)

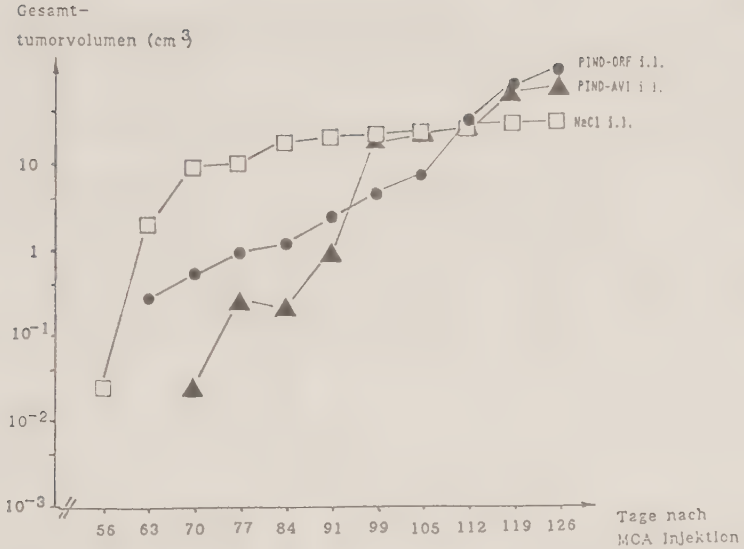


Abbildung 22:

Volumenzuwachs von Tumoren nach s.c. Injektion von Methylcholanthren (MCA) in NMRI Mäusen

Die Tumorummungen der einzelnen Tiere wurden addiert zum Gesamtumorummungen.

- Injektion von
- NaCl i.l. (9 Tiere)
 - ▲ PIND-AVI i.l. (10 Tiere)
 - PIND-ORF i.l. (10 Tiere)

Tabelle 16:

*In vivo: Wirksamkeit von PIND-AVI, PIND-ORF und NaCl-Lösung gegen Methylcholanthren (MCA)-induzierte Tumoren der NMRI Maus (25-30g) ***

Gruppe	Tumorangang bei/von Tag n $\pm$ s			Mortalität [*] bei/von Tag n $\pm$ s		
NaCl i.p.	7/10	93,8	10,8	2/10	115,0	0
i.l.	6/9	74,7	16,4	5/9	111,0	8,9
PIND-AVI i.p.	7/10	94,0	19,3	1/10	106	-
Charge 141 i.l.	10/10	93,9	14,1	1/10	106	-
PIND-ORF i.p.	9/10	93,6	17,9	1/10	124	-
Charge 0417 i.l.	7/10	78,8	19,7	1/10	124	-

* Der Versuch wurde am Tag 126 beendet. Tiere, die >126 Tage mit Tumoren überlebt haben sind daher nicht erfasst.

**Die Mäuse erhielten am Tag "0" 0,7 mg MCA subkutan (s.c.) am Rücken. Behandlung fünfmal mit PIND-AVI oder PIND-ORF oder 0,9%-iger NaCl-Lösung ad injectionem (je 0,3 ml) an den Tagen -2,+7,+21,+35,+49 entweder intraperitoneal (i.p.) oder intraläsional (i.l.)

4. Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen hatten zum Ziel, verschiedene Immunstimulantien, Bacillus Calmette-Guérin (BCG), Corynebacterium parvum (Cp), Poly I:C, Lipopolysaccharid (LPS), New Castle Disease-Virus (ND) und die beiden Paramunitätsinducer PIND-AVI und PIND-ORF in ihrer Wirkung gegen Tumoren *in vitro* und *in vivo* zu vergleichen. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei löslichen Mediatoren - Zytokinen - geschenkt, deren große Bedeutung bei der unspezifischen Abwehr von Tumoren erst in jüngster Zeit erkannt wurde. Tumor Nekrose Faktor (TNF), Interferon (IFN), Interleukin 1 (IL-1), Zytotoxische Faktoren (CF) und andere Zytokine können, wie aus der Literatur bekannt ist, im Serum nach entsprechender Immunstimulation nachgewiesen werden. In der vorliegenden Untersuchung wurde die biologische Aktivität dieser Seren *in vitro* in zwei Testmodellen verglichen: (1) Im L929-Zytotoxizitätstest, der als *in vitro* Test zum Nachweis der Aktivität von TNF breite Anwendung findet, und (2) mit Friend Erythroleukämie Zellen, die sowohl durch Interferonzugabe, als auch durch TNF ihr Verhalten funktionell (Proliferation und Differenzierung) und morphologisch (Zellgröße) ändern. Aktivierte Makrophagen spielen bei der Tumorablewehr nicht nur durch Phagozytose und Antigenpräsentation eine zentrale Rolle, sondern vor allem durch Freisetzung von TNF, IL-1, IFN- α und anderen zytotoxischen Molekülen. Es ist bekannt, daß *in vitro* kultivierte Makrophagen nach Stimulation mit LPS den TNF produzieren und freisetzen. Daher wurden adhäsive Peritoneal-Exsudat mononukleäre Zellen (PEM) *in vitro* kultiviert und potentielle Immunstimulantien zugegeben. Die zellfreien Überstände dieser Kulturen wurden in den beiden oben genannten Tests untersucht.

Nachdem Vorgänge, die im Organismus ablaufen, *in vitro* nur teilweise simuliert werden können, wurden zusätzlich *in vivo* Untersuchungen durchgeführt um die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen. So wurde die Wirkung der Immunstimulantien gegen das Ehrlich Aszites Karzinom und gegen die Friend Erythroleukämie der Maus untersucht. Die Wirkung von PIND-AVI und PIND-ORF wurde auch gegen die induzierte Karzinogenese durch Methylcholanthren überprüft.

Der L929-Zytotoxizitäts-Test ist bei Zugabe von Aktinomycin D (1 µg/ml) ein sehr guter, sensibler Test zum Nachweis von zytotoxischen Serumfaktoren: Es bedarf nur minimaler Mengen wertvoller Seren, die Ergebnisse liegen schon nach 20 Stunden offen. Die photometrische Messung der gefärbten Mikrotiterplatten erfolgt schnell und reproduzierbar. Die Standardisierung des Tests ermöglicht den Vergleich der in verschiedenen Laboratorien gewonnenen Ergebnisse. Es werden bei diesem Test allerdings nur adhäsive, mit Kristallviolett angefärbte Zellen erfasst. Der Test gibt weder Auskunft über den Funktionszustand der Zellen, noch werden lebende Zellen in Suspension berücksichtigt.

Die Ergebnisse zeigen, daß "klassisch" stimuliertes Tumor Nekrose Serum (durch Doppelstimulation mit BCG/LPS oder mit Cp/LPS) von Kaninchen und Mäusen, sowie käuflicher humaner TNF, hohe Einheiten Tumor Nekrotisierende Aktivität (TNA) aufweisen. Es wurde früher angenommen (Carswell et al., 1975), daß LPS allein nicht in der Lage sei, TNF zu induzieren. Die TNF Produktion kann dennoch durch LPS Applikation *in vivo* und *in vitro* stimuliert werden. Durch Stimulation ("priming") des Mononukleären Phagozytose Systems (MPS) mit BCG, Cp oder anderen Substanzen, 8-14 Tage vor Applikation von LPS, können aber deutlich höhere Titer TNF produziert werden (Matthews, 1981; Ziegler-Heitbrock und Riethmüller, 1987). TNF konnte in Seren von Patienten mit bakteriellen, parasitären und anderen Erkrankungen, aber auch bei gesunden Patienten "spontan" gefunden werden, wobei für den Nachweis von TNF die Sensitivität des Testsystems und die Lagerung der Seren eine entscheidende Rolle spielte (Scuderi et al., 1986; Waage et al., 1987). Entgegen der früheren Ansicht, daß TNF gefroren bei -20°C sehr lange stabil bleibt, berichtete WAAGE auf der internationalen Konferenz für Tumor Nekrose Faktor in Heidelberg (Waage et al., 1987), daß Lagerung von TNF sogar bei -80°C einen Aktivitätsverlust bedingt.

Dies könnte auch bei den hier berichteten Versuchen den Aktivitätsverlust von käuflichem TNF durch Lagerung bei -20°C über Monate erklären. Bei der Untersuchung der Kaninchenserum hatten die Seren, die bei -80°C gelagert wurden und nur 2 Wochen alt waren (Kaninchenserum

II; siehe *Tabelle 6*), eine wesentlich höhere Zytotoxizität im erhitzten und im unerhitzten Zustand, als die Kaninchenserum (I) (siehe *Tabelle 5*), die bei -20°C gelagert wurden. Es ist also möglich, daß die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen und -zeiten für diese erhöhte Zytotoxizität verantwortlich sind. Im Test mit den Kaninchenserum II wurde allerdings eine neue Charge Aktinomycin D (Charge Nr. 65F-40121) verwendet. Jedoch war im mitgeführten Laborstandard (Kaninchenserum (I) BCG/LPS) keine Erhöhung der TNA festzustellen. Deshalb sind unterschiedliche Aktinomycin D Chargen für diese Beobachtung wohl kaum verantwortlich zu machen.

Hervorzuheben ist, daß nach Injektion von ND, PIND-AVI, PIND-ORF und LPS ein Anstieg der Zytotoxizität im erhitzten Serum zu finden war. Die Zytotoxizität war 2 Stunden nach Injektion von PIND-AVI und 8 Stunden nach Injektion von PIND-ORF höher, als nach Gabe von LPS. Die mit PIND behandelten Tiere zeigten keine Allgemeinstörungen, während das Kaninchen nach LPS Injektion Symptome des Endotoxinschocks zeigte. Auch die Applikation von ND zeigte leichte Nebenwirkungen.

Nur nach Doppelstimulation mit BCG/LPS oder durch einfache LPS Gabe konnte in Mäuserum ein deutlicher Anstieg der Zytotoxizität des erhitzten Serums gemessen werden, doch war auch hier 4 Stunden nach Injektion von PIND-ORF in NMRI Mäusen eine geringe Zytotoxizität vorhanden.

Die Versuche, die *in vitro* mit dem Klon F4-1 der Friend Erythroleukämie Zelle durchgeführt wurden, hatten zum Ziel, zusätzliche Informationen über die bereits im L929-Zytotoxizitäts-Test untersuchten Seren und PEM Kultur Überstände zu gewinnen: Die Friend Erythroleukämie Zellen sind ein interessantes Modell für *in vitro* Studien, weil sie gegenüber TNF und Interferon sensibel sind. Interferon induziert ihre Differenzierung in niedrigen Dosen (50-500 U/ml), während es in hohen Dosen (1000-10000 U/ml) die DMSO stimulierte Differenzierung hemmt und selbst direkt wachstumshemmend wirkt (Moritz und Kirchner, 1986; Rossi, 1985). Interferonresistente Friend Erythroleukämie Zellklone sind gegen beide Wirkungen gleichermaßen resistent (Gresser, 1985). Es wurde

beschrieben, daß TNF neben antitumoraler Wirkung auch differenzierende Effekte auf verschiedene myeloide Zelllinien hat (Trinchieri et al., 1987; Beran et al., 1986; Moore et al., 1983; Peetre et al., 1986; Takeda et al., 1986). In den *in vitro* Versuchen mit Friend Erythroleukämie Zellen werden also nicht nur die adhäsiven Eigenschaften von Zellen nach Zugabe von zytotoxischen Substanzen überprüft, sondern es läßt sich eine Aussage über den Funktionszustand der Zelle und über ihre Morphologie (gefärbte Ausstriche) machen. Nachteilig an diesem Modell ist, daß die Sensitivität der Friend Erythroleukämie Zellen gegenüber TNF nicht so hoch ist, wie im L929-Zytotoxizitäts-Test (Suyama et al., 1985); es kam bei Zugabe von 5% Serum mit 640 Einheiten TNA /ml zu F4-1 Zellen (DBA/2 Serum nach BCG/LPS Stimulation, nicht erhitzt) nur zu einer deutlichen Proliferationshemmung am sechsten Tag der Inkubation der F4-1 Zellen und nicht zur Zytolyse bereits am zweiten Tag. Allerdings wurde im L929-Zytotoxizitäts-Test die Titration bei einer Serumverdünnung von 1:8 begonnen, das entspricht 12,5% zugegebenem Serum. Der Klon F4-1, der *in vitro* nur minimale Mengen reifer "C Partikel" produziert (Krieg et al., 1978; Ostertag et al., 1978), eignet sich dennoch gut für diese Untersuchungen, weil die antivirale Wirkung der Zytokine, die nicht Gegenstand der Untersuchung ist, dann vernachlässigt werden kann. Dieser Klon differenziert sich, nach Zugabe von 2% DMSO, zu 71% Benzidin positiven (B+) Zellen (Friend, 1978), während andere Klone bis über 90% B+ Zellen aufweisen. In den vorliegenden Untersuchungen erwies sich die Zugabe von 2% DMSO bereits als zytotoxisch. 1,9% DMSO wurde von den Zellen noch toleriert, und die Stimulierbarkeit betrug etwa 60% B+ Zellen.

Seren von Mäusen, die mit dem Interferoninducer Poly I:C behandelt wurden (Bloksma et al., 1983), führten zu einem erhöhten Anteil differenzierter (B+) Zellen, jedoch nicht Seren von mit New Castle Disease-Virus (ND) behandelten Mäusen. Diese ND Seren, wenn sie 8 und 12 Stunden post injectionem gewonnen wurden, verminderten das Wachstum der F4-1 Zellen. Eine Erklärung für diese unerwartete Beobachtung kann darin gesucht werden, daß nach der ND Injektion in Mäusen bereits so hohe Interferontiter induziert wurden, die wachstumshemmend für F4-1 Zellen waren (Kirchner, 1984; Moritz und Kirchner, 1986; Rossi, 1985)).

Die Seren von Mäusen, die nach LPS Stimulation gewonnen wurden, hatten folgende Wirkung in diesem Modell: Das NMRI Serum (50 µg LPS /Maus, nach 2 Stunden gewonnen) und das DBA Serum (500 µg LPS /Maus, nach 8 Stunden gewonnen) waren etwas proliferationshemmend, hatten aber keinen Effekt auf die Differenzierbarkeit, während das Serum von NMRI Mäusen nach LPS Stimulation, das nach 4 und nach 8 Stunden gewonnen wurde, nicht das Wachstum hemmte. Eine deutliche Proliferationshemmung am sechsten Inkubationstag der F4-1 Zellen hatte dagegen das Serum der DBA Mäuse nach BCG/LPS Stimulation. Hierfür wurden im L929-Zytotoxizitäts-Test 640 Einheiten TNA /ml bestimmt. Überstände von DBA/2 PEM Kulturen, die 4 und 24 Stunden nach LPS Stimulation genommen wurden, waren ebenso wachstumshemmend. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß der Zellklon F4-1 sensibel für TNA ist, sich jedoch nicht durch TNA, im Gegensatz zu Interferon, zur Differenzierung anregen läßt. In der Literatur lassen sich in Arbeiten mit anderen Klonen der Friend Erythroleukämie Zelle keine Hinweise finden, daß TNF die Differenzierung dieser Zellen anregt. Zugabe von Seren oder Überständen nach Stimulation mit den Paramunitätsinducern PIND-AVI und PIND-ORF, hatte keine Wachstums- oder Differenzierung der Zellen zur Folge.

Interessant sind auch die Ergebnisse, die mit Überständen von PEM Kulturen in den beiden oben ausgeführten Testsystemen erhalten wurden. Man kann davon ausgehen, daß die nach Injektion von Thioglycolat gewonnenen plastikadhärenten PEM Kulturen über 95% aus Makrophagen bestanden (Männel et al., 1980a). Makrophagen, die Produzenten von TNF (Matthews, 1978; Männel et al., 1980a; Satomi et al., 1981), setzten bei vielen Untersuchern, nach *in vitro* Stimulation mit LPS, innerhalb weniger Stunden hohe Titer TNA frei. In den vorliegenden Untersuchungen gelang es ebenfalls hitzestabile Zytotoxizität in Überständen von LPS stimulierten PEM Kulturen nachzuweisen. Die Zytotoxizität bestand nicht mehr bei Entnahme von Überstand nach 22 bzw. 24 Stunden Inkubation. Nach Zugabe einer größeren Dosis LPS konnte ein höherer Titer TNA gemessen werden, als nach Zugabe einer kleineren Dosis LPS (DBA/2 PEM: Tabelle 10 und Abbildung 11). Daneben erwies sich auch Cp, das von den PEM phagozytiert wurde, als potenter Inducer.

von TNA. Ebenfalls konnte durch Poly I:C ein deutlicher Anstieg der Zytotoxizität festgestellt werden. Von den Chargen Cp und von Poly I:C wurde aber keine Bestimmung des Endotoxingehaltes durchgeführt. Es ist daher nicht auszuschließen, daß diese Wirkung auf bakterielles Endotoxin der Chargen zurückzuführen ist, jedoch müßte der LPS Gehalt dann sehr hoch liegen um allein für die Zytotoxizität verantwortlich zu sein.

Andere Autoren finden nach diesem Versuchsprinzip teilweise eine wesentlich höhere TNA, als in den vorliegenden Untersuchungen. Drei Ursachen kommen dafür in Betracht:

(1) Die Sensitivität der Testdurchführung ist nicht hoch genug. Doch die Messung von käuflichen humanen TNF, der im New York Blood Center auf 10000 Einheiten /ml eingestellt wurde, ergab doppelt so viele Einheiten.

(2) Bei den anderen Autoren handelt es sich um Makrophagen, die nach Infektion der Mäuse mit BCG (Männel et al., 1980a) oder nach Injektion von Cp (Satomi et al., 1981) gewonnen wurden, also schon aktiviert wurden mit Bakterien, die das Mononukleäre Phagozytose System (MPS) stimulieren.

(3) MATTHEWS (1981) fand, daß schon Spuren von LPS im FKS die TNF Produktion anregen. ZIEGLER-HEITBROCK et al. (1986 und 1987) kam zu dem Ergebnis, daß bereits Zugabe von 0,001 ng LPS /ml zu humanen Blutmonozyten die TNF Produktion stimuliert, aber nur, wenn unter absolut LPS freien Bedingungen gearbeitet wurde. Nach zweimaliger LPS Stimulation *in vivo* im Abstand von 6 Stunden konnte kein erneuter Anstieg von TNF gefunden werden (Männel et al., 1980b).

Es ist daher denkbar, daß dauernde LPS Stimulation in geringer Menge zu einer Erschöpfung der Aktivierbarkeit der Makrophagen führt und daher die Antwort auf einen Stimulus schwächer wird, oder gar völlig ausfällt. Thiolglycolat wirkt selbst irritierend. Ein "Zuviel" an Stimulation ist also eine sehr wahrscheinliche Ursache für geringe TNA in den Überständen. Um so wichtiger scheint unter diesem Aspekt eine geringe nachweisbare Zytotoxizität (12,6%) zu sein, wie sie 3 Stunden nach Zugabe von PIND-ORF (Charge 030T) zu NMRI PEM nachweisbar war.

Eine direkte Wirksamkeit aller Immunstimulantien auf L929 und F4-1 Zellen ist sehr unwahrscheinlich: Überstände von PEM Kulturen, die unmittelbar nach Zugabe von Immunstimulantien in sehr hoher Dosis entnommen wurden, die also entnommen wurden, bevor PEM Zellen sie etwa metabolisieren konnten, hatten keinen Einfluß auf Zytotoxizität und Wachstum der Zellen.

Mykotoxine, Ochratoxin A und HT-2 Toxin, sind ubiquitär. Sie wurden in Futtermitteln, in der Nahrungsmittelkette, im Blut und sogar in der Muttermilch nachgewiesen (Bauer und Gareis, 1987; Gareis et al., 1985). Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, daß Spuren dieser Toxine auch im Labortierfutter vorhanden sind. Für T-2 Toxin, das zu HT-2 Toxin durch Abspaltung einer Acetylgruppe metabolisiert wird, konnte eine Stimulation der Kolonien stimulierenden Aktivität (CSA) des Serums nachgewiesen werden (Wolf, 1986). Zum anderen gibt es Angaben über die immunsuppressive Wirkung von Ochratoxin A und HT-2 Toxin (Bauer und Gareis, 1987; Gareis et al., 1985; Haubeck et al., 1981; Creppy et al., 1983; Luster et al., 1987) und über die toxische Wirkung auf *in vitro* kultivierte Makrophagen (Sorenson et al., 1986). Direkte zytotoxische Wirkungen von Mykotoxinen gegen bestimmte Tumorzelllinien *in vitro* sind beschrieben worden (Reubel et al., 1987; Morel-Chaney et al., 1980). Alle diese Wirkungen, ob immunsuppressiv, direkt zytotoxisch oder sogar immunstimulierend, sind bei den durchgeführten Untersuchungen störend. Es wurden zwei Mykotoxine Mäusen injiziert und zu PEM Kulturen gegeben. Diese Seren oder Überstände wurden dann genauso getestet wie die Seren und Überstände, die nach Gabe von Immunstimulantien oder Placebo gewonnen wurden. Die Ergebnisse zeigen, daß in den gewählten Dosierungen (50% und 10% der LD₅₀ bzw. ED₅₀) kein nennenswerter Einfluß der Mykotoxine Ochratoxin A und HT-2 Toxin auf die Testkriterien im L929-Zytotoxizitäts-Test und bei F4-1 Zellen bestand.

Die Vorversuche mit subkutaner Injektion von Ehrlich Aszites Karzinom Zellen ergaben, daß sich solide Tumoren nur sehr selten anbilden und

es häufig zu Spontanheilungen kommt. Eine naheliegende Erklärung hierfür ist die gute Immunogenität der verwendeten Zellen. Diese konnte durch Vakzinierung der Mäuse mit Y-bestrahlten Zellen nachgewiesen werden. Die intraperitoneale Applikation von Ehrlich Aszites Karzinom führte zu konstantem Auftreten von Aszites. Es bestand eine gute Abhängigkeit zwischen inokulierter Zellzahl und Tag der Aszitesanbildung. Die Versuche zur Suppression der Aszitesanbildung durch Vorbehandlung mit Immunstimulantien wurden in drei Zellzahl-niveaus durchgeführt (5×10^5 , 6×10^5 oder $8,8 \times 10^5$ Zellen i.p. /Maus). In allen drei Versuchen war nur *Corynebacterium parvum* (Cp) in der Lage die Mortalität deutlich zu senken. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von HALPERN et al. (1966). In den beiden Versuchen mit 5×10^5 und 6×10^5 Zellen wurde mit einer Gruppengröße von nur 6 Tieren gearbeitet. Deshalb sind die Ergebnisse nur mit großer Vorsicht interpretierbar. Beim mit 40 Tieren pro Gruppe durchgeführten Versuch mit $8,8 \times 10^5$ Zellen zeigte sich dann, daß weder BCG, noch Omnadin[®], Poly I:C oder PIND die Aszitesentstehung und die Mortalität signifikant senken konnten. Von CHEDID et al. (1973) wurde beschrieben, daß BCG gegen Ehrlich Aszites Karzinom i.p. eine Erhöhung der mittleren Überlebenszeit und eine Erniedrigung der Mortalität verursachte und zudem gegen eine syngene lymphoide Leukämie der Maus wirkte.

Beim Versuch mit 1×10^5 F4-1 Zellen /Maus i.p. konnte nur durch Injektion von BCG eine signifikante Verlängerung der mittleren Überlebenszeit erzielt werden. Es ist hieraus ersichtlich, daß nicht jedes Immunstimulans in jedem Tumormodell gleich gute Wirkungen hat. Experimentelle Daten mit *in vivo* Tumormodellen sind nur mit großer Vorsicht auf andere Tumormodelle zu übertragen (Bast und Bast, 1976).

Die Karzinogenese von Methylcholanthren (MCA) induzierten Tumoren konnte durch fünffache Behandlung mit PIND-AVI und PIND-ORF nicht verhindert werden, doch wurde folgendes deutlich:

(1) Intraperitoneale Injektion von PIND-AVI oder PIND-ORF hat keinen Einfluß auf die Bewertungskriterien (Tumorangang, Tumolvolumen, Mortalität).

(2) Intraläsionale Injektion von PIND-AVI oder PIND-ORF verringert die Mortalität im Beobachtungszeitraum (126 Tage; Mortalität: Placebo 55%, PIND-AVI oder PIND-ORF 10%)

(3) Die Tumoren wachsen bei intraläsionaler Injektion von PIND-AVI oder PIND-ORF anfänglich langsamer.

Diese Ergebnisse, in Gruppen mit nur 10 Tieren erhalten, stimmen überein mit der von anderen Autoren beschriebenen Beobachtung, daß intraläsionale Applikation von Immunstimulantien eine bessere Tumorsuppression bewirkt, als systemische Applikation (Scott, 1974; Likhite, 1975; Zbar et al., 1972; Steinmetz et al., 1987). MCA wirkt immundepressiv (Piessens et al., 1971; Stjernswärd, 1966); diese Immundepression kann aber durch BCG verhindert werden. So verzögert die intraläsionale Applikation von BCG das Angehen von MCA induzierten Tumoren (Stjernswärd, 1966; Tokunaga et al., 1974).

Es können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

(1) Die Reaktion der körpereigenen Abwehr auf Immunstimulation ist sehr differenziert. Sie hängt von den verwendeten Immunstimulantien und von den durchgeführten Tests ab.

(2) *In vivo* Tumormodelle sind nicht geeignet, Aufschluß über die einzelnen immunologischen Reaktionen des Organismus zu geben. Hierzu sind sensitive *in vitro* Methoden nötig.

(3) Daten der verschiedenen Tumormodelle, die in verschiedenen Tierexperimenten gewonnen wurden, können nur sehr kritisch miteinander verglichen werden. Eine Interpretation dieser Daten, mit dem Ziel einer therapeutischen Anwendung am Menschen, darf nur mit großer Vorsicht erfolgen.

(4) Den bakteriellen Immunstimulantien (BCG,Cp,LPS) kann die bereits beschriebene Wirkung gegen Tumoren grundsätzlich bestätigt werden. Die bakteriellen Präparate hatten auch in den vorliegenden Untersuchungen große Nebenwirkungen, weshalb der therapeutische Einsatz sehr limitiert sein wird.

(5) Die Interferoninducer Poly I:C und ND, sowie der Paramunitäts-inducer PIND-ORF, waren in der Lage, je nach Applikation, in Seren und Überständen proliferationshemmende oder differenzierende Aktivitäten zu induzieren. Diese Beobachtung sollte Anlaß zu weitergehenden Untersuchungen sein.

(6) Die Lagerungsbedingungen von Seren haben einen großen Einfluß auf ihre Wirksamkeit in den durchgeführten Tests. Es sind also Versuchspläne darauf abzustimmen, daß möglichst frische Seren verarbeitet werden.

(7) Es ist mit den durchgeführten biologischen Tests nur möglich, eine Aussage über die Aktivität des getesteten Serums oder des PEM Überstandes zu machen. Nicht jedoch können diese Aktivitäten einem bestimmten Molekül zugeordnet werden. Die Ergebnisse aber zeigen, daß eine biochemische Analyse der Seren und PEM Überstände, sowie Nachweise mit monoklonalen Antikörpern, gerechtfertigt erscheinen. Zudem würde eine Vergleichsuntersuchung mit murinen, hochgereinigten oder rekombinierten TNF, IFN- α , IFN- γ und IL-1 dazu beitragen, die Befunde besser zu differenzieren.

5. Zusammenfassung

Verschiedene Immunstimulantien (Bacillus Calmette-Guérin (BCG), *Corynebacterium parvum* (Cp), Poly I:C, Lipopolysaccharid (LPS), New Castle Disease-Virus (ND) und die Tierpockenpräparate PIND-AVI und PIND-ORF) wurden Mäusen und Kaninchen injiziert.

Seren der so vorbehandelten Tiere wurden *in vitro* auf zytotoxische Aktivität im L929-Zytotoxizitäts-Test untersucht. Doppelbehandlung mit BCG/LPS oder Cp/LPS und Behandlung mit LPS, ND, PIND-AVI oder PIND-ORF erhöhten in Seren von Kaninchen die Zytotoxizität, während bei Mäuseseren nur nach Behandlung mit BCG/LPS oder LPS allein zytotoxische Wirkungen beobachtet werden konnten.

Die Seren wurden auch *in vitro* an der murinen Proerythroblastenlinie "Friend Erthroleukämie Klon F4-1" getestet. Murines Serum nach Behandlung mit Poly I:C förderte die Differenzierung (Hämoglobineinlagerung) der Zellen, und Seren nach Behandlung mit LPS oder ND hemmten die Zellvermehrung.

Murine adhäsive Peritoneal-Exsudat mononukleäre Zellen wurden *in vitro* kultiviert und Immunstimulantien zugegeben. Die zellfreien Überstände wurden auf L929 und auf F4-1 Zellen, wie die Seren, getestet. Cp, LPS, Poly I:C und PIND-ORF stimulierten, in zeitlicher Abhängigkeit, im Überstand der Kulturen zytotoxische Aktivität gegen L929 Zellen. Die gleichen Überstände hatten auf F4-1 Zellen keine Wirkung.

In vivo wurden die Immunstimulantien gegen zwei häufig verwendete Tumorzelllinien verglichen. Cp war das einzige Immunstimulans, welches das intraperitoneale Angehen eines Ehrlich Aszites Karzinoms signifikant supprimierte. Injektion von BCG verlängerte signifikant die Überlebenszeit von DBA/2 Mäusen mit intraperitoneal inokulierten F4-1 Zellen.

Fünffache intraläsionale Behandlung von Mäusen mit PIND-AVI oder PIND-ORF, nach subkutaner Injektion des Karzinogens Methylcholanthren, erniedrigte die Mortalität und verlangsamte das Tumorstadium.

Die Untersuchungen zeigen, daß die Reaktion der körpereigenen Abwehr auf Immunstimulation sehr differenziert ist, und vom verwendeten Immunstimulans und dem durchgeführten Testsystem abhängig ist. In dieser Hinsicht können Ergebnisse von Tumormodellen nur sehr vorsichtig bewertet werden. Die beiden *in vitro* Tests stellen einfache und schnell durchführbare Screening-Methoden dar, mit denen Seren und Zellkulturüberstände auf biologische Wirksamkeit gegen Tumorzelllinien überprüft werden können. Sie dienen als gute Orientierung vor biochemischen oder immunochemischen Analysen.

Summary

INVESTIGATIONS ON THE EFFICACY OF IMMUNOSTIMULANTS FROM MICROORGANISMS AND OF ANIMAL POX VIRUS PREPARATIONS AGAINST TUMORS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Several immunostimulants (Bacillus Calmette-Guérin (BCG), *Corynebacterium parvum* (Cp), Poly I:C, lipopolysaccharide (LPS), New Castle Disease-Virus (ND), and the animal pox virus preparations PIND-AVI and PIND-ORF) were injected into mice and rabbits.

Sera obtained from these animals were tested *in vitro* for cytotoxic activity by an L929-cytotoxicity-assay. Double pretreatment with BCG/LPS or Cp/LPS and single injections of LPS, ND, PIND-AVI, or PIND-ORF augmented the cytotoxicity of rabbit sera. In murine sera cytotoxic effects could be observed only after pretreatment with BCG/LPS or LPS alone.

Furthermore the sera were tested on the murine proerythroblast cell line "Friend's erythroleukemia, clone F4-1". These cells were stimulated to differentiate (hemoglobin-synthesis) by murine serum obtained after pretreatment with Poly I:C. Sera obtained after pretreatment with LPS or ND inhibited the cell growth.

Murine adhesive peritoneal-exudate mononuclear cells were cultured *in vitro* and immunostimulants were added. The cell free supernatants were tested on L929 and F4-1 cells in the same way as described for the sera above. Cp, LPS, Poly I:C, and PIND-ORF stimulated in the supernatants cytotoxic activity against L929 cells in a time-dependent way. The same supernatants did not show any effect on F4-1 cells.

The immunostimulants were tested *in vivo* against two common tumor cell lines: Cp was the only immunostimulant that significantly suppressed the growth of intraperitoneally inoculated Ehrlich's ascites carcinoma. BCG significantly prolonged the survival-time of DBA/2 mice inoculated with F4-1 cells intraperitoneally.

After subcutaneous injection of the carcinogenic methylcholanthrene into NMRI mice, fivefold intralesional injection of PIND-AVI or PIND-ORF decreased the mortality rate and reduced the tumor growth.

These investigations show that the reaction of the host's defence after immunostimulation is very complex and depends on the immunostimulant and on the assay used. Furthermore they show that results from experimental tumor models can only be assessed by taking this fact into careful consideration. The two *in vitro* assays are simple and rapid screening tests to examine the biological activity of sera and tissue culture supernatants against tumor cell lines. They are very useful as orientation prior to biochemical or immunochemical analyses.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMS D.O., K.J. KAO, R. FARB, S.V. PIZZO, 1980:
Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. II.
Secretion of a cytolytic factor by activated macrophages and its
relationship to secreted neutral proteases.
J. Immunol. 124, 293-300.
- ADERKA D., H. HOLTMANN, L. TOKER, T. HAHN, D. WALLACH, 1986:
Tumor necrosis factor induction by Sendai Virus.
J. Immunol. 136, 2938-2942.
- AFFABRIS E., C. JEMMA, G.B. ROSSI, 1982:
Isolation of interferon-resistant variants of Friend
Erythroleukemia cells: effects of interferon and ouabain.
Virology 120, 441-452.
- AGGARWAL B.B., W.J. KOHR, P.E. HASS, B. MOFFAT, S.A. SPENCER, W.J.
HENZEL, T.S. BRINGMANN, 1985:
Human tumor necrosis factor.
J. Biol. Chem. 260, 2345-2354.
- ARAKAWA JR. S., G. HAMAMI, K. UMEZU, S. KAMIDONO, J. ISHIGAMI, S.
ARAKAWA, 1987:
Clinical trial of attenuated vaccinia virus AS strain in the
treatment of advanced carcinoma.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 113, 95-98.
- ATTIA M.A.M., D.W. WEISS, 1966:
Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice.
V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice
infection with mammary tumor virus.
Cancer Res. 41, 839-844.
- BACH F.H., D.H. SACHS, 1987:
Transplantation immunology.
N. Engl. J. Med. 317, 489-492.

- BAST R.C., B.S. BAST, 1976:
Critical revue of previously reported animal studies of tumor immunotherapy with nonspecific immunostimulants.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 277, 60-93.
- BAUER J., M. GAREIS, 1987:
Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette.
J. Vet. Med. B 34, 613-627.
- BENTLEY C., B. ZIMMER, U. HODDING, 1981:
The macrophage as a source of complement components.
Lymphokines 4, 197-231.
- BERAN M., B.S. ANDERSON, J. GUTTERMANN, K.B. MCCREDIE, 1986:
Recombinant tumor necrosis factor (TNF-r) and recombinant lymphotoxin (LT-r) inhibits both normal human granulocyte-macrophage progenitors (GM-CFC) and leukemic clonogenic cell from patients with acute (AML) and chronic (CML) myelogenous leukemias.
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 27, 77 Meet.323.
- BEUTLER B., I.W. MILSARK, A. CERAMI, 1985:
Passive immunization against Cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin.
Science 229, 869-871.
- BEUTLER B., A. CERAMI, 1986:
Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin.
Nature 320, 584-588.
- BEUTLER B., A. CERAMI, 1987:
Cachectin: more than a tumor necrosis factor.
N. Engl. J. Med. 316, 379-385.
- BEYAERT R., P. SUFFYS, F. VAN ROY, W. FIERIS, 1987: (Kongreßreferat)
Inhibition of TNF cytotoxicity by protease inhibitors.
Immunobiol. 175, 3.
- BITTER-SUERMAN D., 1983:
Das Komplementsystem: Physiologische Funktion und klinische Bedeutung.
Deutsches Arztebl. 51/52, 27-42.

- BLOKSMA N., C.F. KUPER, F.M. HOFHUIS, B. BENAÏSSA-TROUW, J.M. WILLERS, 1983:
Antitumor activity of endotoxin, Concanavalin A and Poly I:C and their ability to elicit tumor necrosis factor, cytostatic factors and interferon *in vivo*.
Cancer Immunol. Immunother. 16, 35-39.
- CARSWELL E.A., L.J. OLD, R.L. KASSEL, S. GREEN, N. FIORE, B. WILLIAMSON, 1975:
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3666-3670.
- CHEDID L., A. LAMENSANS, F. PARANT, 1973:
Protective effects of delipidated mycobacterial cells and purified walls against Ehrlich carcinoma and syngeneic lymphoid leukemia in mice.
Cancer Res. 33, 2187-2195.
- CHEDID L., A. MORIN, N. PHILLIPS, 1982:
Potential use of muramyl peptides in cancer therapy and prevention.
In: *Bacteria and Cancer*; ed. by J. Jeljaszewicz, Academic Press, London
- COLE R.J., R.H. COX, 1981:
Handbook of toxic fungal metabolites.
Academic Press, London
- COLLINS T., L.A. LAPIERRE, W. FIERIS, J.L. STROMINGER, J.S. POBER, 1986:
Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 446-450.
- CREASEY A.A., L.V. DOYLE, M.T. REYNOLDS, T. JUNG, L.S. LIN, C.R. VITT, 1987:
Biological effects of recombinant human tumor necrosis factor and its novel muteins on tumor and normal cell lines.
Cancer Res. 47, 145-149.

- CROSS A.S., G.H. LOWELL, J. PALMBLAD, J.C. SADOFF, L. YOUNG, M. BERGER, 1985:
Mechanism of priming of human neutrophils by a soluble lymphoblastoid cell factor.
J. Immunol. 135, 2074-2083.
- CREPPY E.E., F.C. STORMER, R. RÖSCHENTHALER, G. DIRHEIMER, 1983:
Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxiochratoxin A and ochratoxin a, on the immune response in mice.
Infect. Immun. 39, 1015-1018.
- CURRIE G.A., 1978:
Activated macrophages kill tumor cells by releasing arginase.
Nature 273, 758-759.
- DARZYNKIEWICZ Z., B. WILLIAMSON, E.A. CARSWELL, L.J. OLD, 1984:
Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor.
Cancer Res. 44, 83-90.
- DAYER J.M., B. BEUTLER, A. CERAMI, 1985:
Cachectin /tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts.
J. Exp. Med. 162, 2163-2168.
- DEGLIANTONI G., M. MURPHY, M. KOBAYASHI, M.K. FRANCIS, B. PERUSSIA, G. TRINCHIERI, 1985:
Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon.
J. Exp. Med. 162, 1512-1530.
- DINARELLO C.A., J.G. CANNON, S.M. WOLFF, H.A. BERNHEIM, B. BEUTLER, A. CERAMI, 1986:
Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1.
J. Exp. Med. 6, 1433-1450.
- DINARELLO C.A., 1987: (Kongreßreferat)
Interleukin 1: multiple biological properties and synergism with tumor necrosis factor.
Immunobiol. 175, 9.

DRÖGE W., 1987: (Kongreßreferat)

Immunological consequences of TNF treatment.
Immunobiol. 175, 10.

ERFLE V., L. STRUBEL, A. LUZ, R. HEHLMANN, A. MAYR, 1983:

The influence of paramunisation, tumor cell vaccination and whole body irradiation on the growth of radiation induced murine osteosarcoma.

Zbl. Vet. Med. B 30, 36-47.

FITCH W.L., 1986:

T-cell clones and T-cell receptors.
Microbiol. Rev. 50, 50.

FLEISCHER B., 1986a:

Lysis of bystander target cells after triggering of human cytotoxic T lymphocytes.

Eur. J. Immunol. 16, 1021-1024.

FLEISCHER B., D.J. SCHENDEL, D. VON STELDERN, 1986b:

Triggering of the lethal hit in human cytotoxic T lymphocytes: a functional role for a 103-kDa T cell-specific activation antigen.

Eur. J. Immunol. 16, 741-746.

FLEISCHER B., 1987:

Antigen-independent T cell activation: A novel pathway of human T cell activation via a 103 kD T cell activation antigen.

J. Immunol. 138, 1346.

FLICK D.A., G.E. GIFFORD, 1984:

Comparison of *in vitro* cytotoxic assays for tumor necrosis factor.
J. Immunol. Meth. 68, 167-175.

FOGLER W.E., I.J. FIDLER, 1985:

Nonselective destruction of murine neoplastic cells by syngeneic tumoricidal macrophages.

Cancer Res. 45, 14-18.

FRIEND C., 1956:

The isolation of a virus causing a malignant disease of the hematopoietic system in adult swiss mice.

Proc. Am. Ass. Cancer Res. 2, 106.

- FRIEND C., 1978:
The phenomenon of differentiation in murine erythroleukemic cells.
Harvey Lect. 72, 253-281.
- GAREIS M., J. BAUER, B. GEDEK, 1985:
Fusarientoxine in Futtermitteln. Nachweis und Vorkommen von Trichothecenen.
Tierärztl. Prax. Suppl. 1, 8-19.
- GAUTAM S.C., K. BECKMAN, J.R. BATTISTO, 1986:
Natural cytotoxic T cells (NCTC) that differ from natural killer (NK) and natural cytotoxic (NC) cells are present in Peyer's patches of mice.
Cell. Immunol. 101, 463-475.
- GIDLUND M., A. ÖRN, M. WIGZELL, 1978:
Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers.
Nature 273, 759-760.
- GIFFORD G.E., M.L. LOHMANN-MATTHES, 1987:
Gamma Interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide.
J. Natl. Cancer Inst. 78, 121-124.
- GISSELBRECHT S., S. FICHELSON, B. SOLA, D. BORDEREAUX, A. HAMPE, C. ANDRÉ, F. GALIBERT, 1987:
Frequent c-fms activation by proviral insertion in mouse myeloblastic leukemias.
Nature 329, 259-261.
- GRANGER G.A., B. AVERBROOK, R.S. YAMAMOTO, T. ULICH, I. MASUNAKA, S. ORR, E. JEFFES, 1987: (Kongreßreferat)
Human α lymphotoxin: pharmacokinetics and effects on tumors and normal tissues *in vivo*.
Immunobiol. 175, 15-16.

- GRAY P.W., B.B. AGGARWAL, C.V. BENTON, T.S. BRINGMAN, W.J. HENZEL, J.A. JARRETT, D.W. LEUNG, B. MOFFAT, P. NG, L.P. SVEDERSKY, M.A. PALLADINO, G.E. NEDWIN, 1984:
Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity.
Nature 312, 721-724.
- GRESSER I., 1985:
How does interferon inhibit tumor growth?
Interferon 6, 93-126.
- GRESSER I., F. BELARDELLI, J. TAVERNIER, W. FIERIS, F. PODO, D. WOODROW, J. MOOS, 1987: (Kongreßreferat)
Similarities and dissimilarities in the effects of TNF and IFN α/β on tumors and suckling mice.
Immunobiol. 175, 2.
- HA D.K., S.W. LEUNG, K.P. FUNG, Y.M. CHOY, C.Y. LEE, 1985:
Role of lipid A of endotoxin in the production of tumor necrosis factor.
Mol. Immunol. 22, 291-294.
- HALPERN B.N., G. BIOZZI, C. STIFFEL, D. MOUTON, 1966:
Inhibition of tumor growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*.
Nature 212, 853-854.
- HARANAKA K., N. SATOMI, 1981:
Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on human cancer cells *in vitro*.
Jpn. J. Exp. Med. 51, 191-194.
- HARANAKA K., N. SATOMI, A. SAKURAI, R. HARANAKA, 1984:
Role of first stimulating agents in the production of tumor necrosis factor.
Cancer Immunol. Immunother. 18, 87-90.
- HAUBECK H.D., G. LORKOWSKI, E. KÖSCH, R. RÖSCHENTHALER, 1981:
Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine.
Appl. environ. Microbiol. 41, 1040-1042.

- HELSON L., S. GREEN, E.A. CARSWELL, L.J. OLD, 1975:
Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells.
Nature 258, 731-732.
- HIBBS jr. J.B., 1974:
Heterocytolysis by Macrophages activated by *Bacillus Calmette-Guérin*: lysosome endocytosis into tumor cells.
Science 184, 468-471.
- HIRAI M., N. OKAMURA, Y. TERANO, M. TSUIJMOTO, H. NAKAZATO, 1987:
Production and characterization of monoclonal antibodies to human tumor necrosis factor.
J. Immunol. Meth. 96, 57-62.
- JANIAK M., W. BUDZYNSKI, B. GNATOWSKI, C. RADZIKOWSKI, S. SZMIGIELSKI, J. JELJASZEWICZ, G. PULVERER, 1984:
Stimulatory effect of *Propionibacterium granulosum* KP-45, Glucan and pyran copolymer on the activity of natural killer (NK) cells in murine lungs.
Immunobiol. 167, 328-337.
- KAPP A., E. SCHÖPF, 1987: (Kongreßreferat)
Human tumor necrosis factor- α - a potent activator of the oxidative metabolism in human polymorphonuclear neutrophilic granulocytes (PMN).
Immunobiol. 175, 19-20.
- KAUFMANN S.H.E., 1987:
Lymphokine, Interleukine, Zytokine: Funktion und Wirkmechanismus.
Immun. Infekt. 15, 127-134.
- KAWA A., S. ARAKAWA, 1987:
The effect of attenuated vaccinia virus AS strain on multiple myeloma; A case report.
Japan. J. Exp. Med. 57, 79-81.
- KAWAKAMI M., S. ISHIBASHI, H. OGAWA, T. MURASE, F. TAKAKU, S. SHIBATA, 1987:
Cachectin /TNF as well as interleukin-1 induces prostacyclin synthesis in cultured vascular endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 141, 482-487.

KIRCHNER H., 1984:

Interferons, a group of multiple lymphokines.
Springer Semin. Immunopathol. 7, 347-374.

KRIEG C.J., W. OSTERTAG, U. CLAUSS, I.B. PRAGNELL, P. SWETLY, G.
ROESLER, B.J. WEIMANN, 1978:

Increase in intracisternal A-type particles in Friend cells during
inhibition of Friend virus (SFFV) release by interferon or
azidothymidine.
Exp. Cell Res. 116, 21-29.

KROENKE M., E. SCHLUETER, K. PFIZENMAIER, 1987:

Tumor necrosis factor inhibits myc expression in HL-60 cells at
the level of mRNA transcription.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 469-473.

KUNKEL S.L., S.W. CHENSUE, S.H. PHAN, 1986:

Prostaglandins as endogenous mediators of
interleukin 1 produktion.
J. Immunol. 136, 186-192.

LANGE W., K.N. MASIHI, 1987:

Bericht über das Internationale Symposium über Immunmodulatoren
im Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes.
Bundesgesundheitsbl. 30, 353-357.

LARRICK J.W., S.L. KUNKEL, 1986:

Is Reye's syndrome caused by augmented release of tumor
necrosis factor?.
Lancet July 19., 1986, 132-133.

LATTIME E.C., O. STUTMAN, 1987: (Kongreßreferat)

Murine natural cytotoxic (NC) cell activity and its human
equivalent are augmented by interleukin 2 and mediated by tumor
necrosis factor (TNF).
Immunobiol. 175, 20.

LEDER A., P. LEDER, 1975:

Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in
cultured erythroleukemic cells.
Cell 5, 319-322.

LIKHITE V.V., 1975:

Rejection of mammary adenocarcinoma cell tumors in DBA/2 mice immunocompromised by thymectomy and treatment with antithymocyte serum.
J. Immunol. 114, 1736-1741.

LUSTER M.I., D.R. GERMOLEC, G.R. BURLESON, C.W. JAMESON, M.F.

ACKERMANN, K.R. LAMM, H.T. HAYES, 1987:
Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A.
Cancer Res. 47, 2259-2263.

MÄNNEL D.N., R.N. MOORE, S.E. MERGENHAGEN, 1980a:

Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing-factor).
Infect. Immun. 30, 523-530.

MÄNNEL D.N., M.S. MELTZER, S.E. MERGENHAGEN, 1980b:

Generation and characterization of lipopolysaccharide-induced and serum-derived cytotoxic factor for tumor cells.
Infect. Immun. 28, 204-211.

MARCH C.J., B. MOSLEY, A. LARSEN, D.P. CERRETTI, G. BRAEDT, V.

PRICE, S. GILLIS, 1985:
Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin 1 complementary DNAs.
Nature 315, 641-647.

MARTIN M., U. KYAS, R. KROGGER, K. RESCH, 1987: (Kongreßreferat)

Biological and molecular properties of the receptor for interleukin 1 on tumor cells.
Immunobiol. 175, 28-29.

MATTHEWS N., 1978:

Tumor necrosis factor from the rabbit. II. Production by monocytes.
Br. J. Cancer 38, 310-315.

MATTHEWS N., 1981:

Tumor necrosis factor from the rabbit. V. Synthesis *in vitro* by mononuclear phagocytes from various tissues of normal and BCG-injected rabbits.
Br. J. Cancer 44, 418-424.

- MATTHEWS N., M.L. NEALE, S.K. JACKSON, J.M. STARK, 1987:
 (Kongreßreferat)
 Are free radicals involved in tumor cytotoxicity by TNF?
 Immunobiol. 175, 21.
- MAYR A., H. STICKL, M. WESTHUES, W. GILLESBERGER, D. SCHWARZ, B. BIBRACK, 1977:
 Therapie von Herpes Zoster durch aktive Prämunisierung. 1.
 Therapiemöglichkeiten: Grundlagen und Prinzip der Prämunisierung -
 Prämunisierung.
 Fortschr. Med. 95,87-93.
- MAYR A., M. BÜTTNER, S. PAWLAS, V. ERFLE, B. MAYR, R. BRUNNER, K. OSTERKORN, 1986:
 Vergleichende Untersuchungen über die immunstimulierende
 (paramunisierende) Wirksamkeit von BCG, Levamisol,
 Corynebacterium parvum und Präparaten aus Pockenviren in
 verschiedenen "in vivo" und "in vitro" - Testen.
 J. Vet. Med. B 33, 321.
- MESTAN J., W. DIGEL, S. MITTNACHT, H. HILLEN, D. BLOHM, A. MOELLER, 1986:
 Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor *in vitro*.
 Nature 323, 816-819.
- MITCHELL M.S., R.I. MURAHATA, 1985:
 Modulation of immunity by Bacillus Calmette-Guérin (BCG).
 In: The modulation of immunity -1st ed.;ed. by M.S. Mitchell,
 Pergamon Press, Oxford.
- MOORE M.A., J. GABRILOVE, A.P. SHERIDAN, 1983:
 Therapeutic implications of serum factors inhibiting proliferation
 and inducing differentiation of myeloid leukemic cells.
 Blood Cells 9, 125-144.
- MOREL-CHANEY E., P. BURTIN, G. TRINCAL, C. FRAYSSINET, 1980:
 Cytostatic effects of T-2 toxin on cultured human neoplastic
 cells of intestinal origin.
 Bull. Cancer 67, 149-154.
- MORITZ T., H. KIRCHNER, 1986:
 The effect of interferons on cellular differentiation.
 Blut 53, 361-370.

MÜLLER-BRUNECKER G., 1983:

Vergleich der Wirkung von viralen Paramunitätsinducern, BCG und Levamisol auf das Wachstum eines strahleninduzierten Transplantat-Osteosarkoms der Maus.
Vet. Med. Diss., München

MUNKER R., J. GASSON, M. OGAWA, H.P. KOEFFLER, 1986:

Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor.
Nature 323, 79-82.

NAKAGAWARA A., N.M. DESANTIS, N. NOGUEIRA, C.F. NATHAN, 1982:

Lymphokines enhance the capacity of human monocytes to secrete reactive oxygen intermediates.
J. Clin. Invest. 70, 1042-1048.

NATHAN C.F., S.C. SILVERSTEIN, L.H. BRUKNER, Z.A. COHN, 1979:

Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity.
J. Exp. Med. 149, 100-113.

NATHAN C.F., H.W. MURRAY, M.E. WIEBE, B.Y. RUBIN, 1983:

Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity.
J. Exp. Med. 158, 670-689.

NAWROTH P.P., I. BANK, D. HANDLEY, J. CASSIMERIS, L. CHESS, D. STERN, 1986:

Tumor necrosis factor /cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1.
J. Exp. Med. 163, 1363-1375.

NEDWIN G.E., L.F. SVEDERSKY, T.S. FRINGMAN, M.A. FALLADINO JR., D.V. GOEDDEL, 1985:

Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta.
J. Immunol. 135, 2492-2497.

NISSEN-MEYER J., R. AUSTGULEN, T. ESPEVIK, 1987:

Comparison of the tumor necrosis factor and the monocyte derived cytotoxic factor involved in monocyte-mediated cytotoxicity.
Cancer Res. 47, 2251-2258.

NJEUMAN N., 1982:

Mononuclear phagocytes as producers of interferon.
Lymphokines 7, 165-202.

OLD L.J., 1985:

Tumor necrosis factor (TNF).
Science 230, 630-632.

OLD L.J., 1987: (Kongreßreferat)

TNF: pleiotropic actions and interactions.
Immunobiol. 175, 24.

ONOZAKI K., K. MATSUSHIMA, B.B. AGGARWAL, J.J. OPPENHEIM, 1985:

Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines.
J. Immunol. 135, 3962-3968.

ORKIN S.H., F.I. HAROSI, P. LEDER, 1975:

Differentiation in erythroleukemic cells and their somatic hybrids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 98-102.

ORTALDO J.R., J.R. RANSOM, T.J. SAYERS, R.B. HERBERMANN, 1986a:

Analysis of cytostatic/cytotoxic lymphokines: Relationship of natural killer cytotoxic factor to recombinant lymphotoxin, recombinant tumor necrosis factor, and leukoregulin.
J. Immunol. 137, 2857-2863.

ORTALDO J.R., L.H. MASON, B.J. MATHIESON, S.M. LIANG, D.A. FLICK, R.B. HERBERMAN, 1986b:

Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumor necrosis factor.
Nature 321, 700-702.

OSTERTAG W., C.J. KRIEG, T. COLE, I.B. PRAGNELL, P. SWETLY, B.J. WEIMANN, S.K. DUBE, 1978:

Induction of intracisternal A-type particles during Friend cell differentiation.
Exp. Cell Res. 116, 31-37.

- PALLADINO M.A., S. KRAMS, D.W. WARA, M.R. SHALABY, A.J. AMMAN, 1986:
Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma induce neutrophils from normal and chronic granulomatous disease patients to release superoxide.
Clin. Res. 34, 502A.
- PALOMBELLA V.J., D.J. YAMASHIRO, F.R. MAXFIELD, S.J. DECKER, J. VILCEK, 1987:
Tumor necrosis factor increases the number of epidermal growth factor.
J. Biol. Chem. 5, 1950-1954.
- PARANT M., F. PARANT, M.A. VINIT, L. CHEDID, 1987:
Protective action of recombinant human tumor necrosis factor (TNF) against experimental bacterial or fungal infection.
C.R. Seances Acad. Sci. Ser. 3 304, 1-4.
- PEETRE C., U. GULLBERG, E. NILSON, I. OLSSON, 1986:
Effects of recombinant tumor necrosis factor on proliferation and differentiation of leukemic and normal hemopoietic cell *in vitro*. Relationship to cell surface receptor.
J. Clin. Invest. 78, 1694-1700.
- PENNICA D., G.E. NEDWIN, J.S. HAYFLICK, P.H. SEEBURG, R. DERYNCK, M.A. PALLADINO, W.J. KOHR, 1984:
Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.
Nature 312, 724-729.
- PFIZENMAIER K., P. SCHEURICH, C. SCHLÜTER, M. KRÖNKE, 1987:
Tumor necrosis factor enhances HLA-A,B,C, and HLA-DR gene expression in human tumor cells.
J. Immunol. 138, 975-980.
- PFREUNDSCHUH M., 1986:
Zytokine und monoklonale Antikörper - Immunologische Ansätze in der Tumorthherapie.
Fortschr. Med. 104, 973-976.

- PIESSENS W., R. HEIMANN, N. LEGROS, J.C. HENSON, 1971:
Effect of bacillus Calmette-Guérin on mammary tumor formation and cellular immunity in dimethylbenz (a) anthracene-treated rats.
Cancer Res. 31, 1061-1065.
- PODACK E.R., 1987: (Kongreßreferat)
Composition and function of CTL granules.
Immunobiol. 175, 28.
- PROIETTI E., F. BELARDELLI, P. PUDDU, G. CAPRINELLI, M. DI VITO, W. FIERS, I. GRESSER, 1987: (Kongreßreferat)
Tumor necrosis factor induces early histologic and metabolic changes in Friend leukemia cell tumors and fibrosarcomas in mice.
Immunobiol. 175, 99.
- PUJOL BORRELL R., I. TODD, M. DOSHI, G.F. BOTTAZZO, R. SUTTON, D. GRAY, 1987:
HLA class II induction in human islet cell by interferon-gamma plus tumor necrosis factor or lymphotoxin.
Nature 326, 304-306.
- RANSOM J.H., C.H. EVANS, R.P. MCCABE, N. POMATO, J.A. HEINBAUGH, M. CHIN, M.G. HANNA JR, 1985:
Leukoregulin, a direct acting anticancer immunological hormone that is distinct from lymphotoxin and interferon.
Cancer Res. 45, 851-862.
- REGELSON W., 1985:
The biological activity of the synthetic polyanion, pyran copolymer (diveema, MVE, 46015) and the heterocyclic bis deae fluorenone derivative, tilorone and congeners: clinical and laboratory effects of these agents as modulators of host resistance.
In: The modulation of immunity -1st ed.;ed.by M.S.Mitchell, Pergamon Press, Oxford
- RENOUX G., 1985:
Modulation of immunity by levamisole and DTC. .
In: The modulation of immunity -1st ed.;ed. by M. S. Mitchell, Pergamon Press, Oxford

- REUBEL G., 1983:
Gewinnung von Mediatoren aus Zellkulturen zur Stimulierung der unspezifischen Infektabwehr (Paramunisierung).
Vet. Med. Diss., München
- REUBEL G.H., M. GAREIS, W.M. AMSELGRUBER, 1987:
Cytotoxicity evaluation of mycotoxins by an MTT-bioassay.
Mycotoxin Res. 3, 85-96.
- REVEL M., A. ZILBERSTEIN, R. RUGGIERI, L. CHEN, M. GABAI, Y. MORY, R. MICHALEVICH, 1987: (Kongreßreferat)
A multifunctional TNF-inducible cytokine: IFN- β 2.
Immunobiol. 175, 29.
- RIVIERE Y., A.G. HOVANESSIAN, 1983:
Direct action of interferon and inducers of interferon on tumor cells in athymic nude mice.
Cancer Res. 43, 4596-4599.
- RIVIERE Y., A.G. HOVANESSIAN, 1984:
Antitumoral action of interferon and Poly(A)Poly(U) on HeLa xenografts in the nude mouse.
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 135 C, 333-343.
- ROSENBERG S.A., 1985:
Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer.
J. Natl. Cancer Inst. 75, 595-603.
- ROSSI G.B., 1985:
Interferons and cell differentiation.
Interferon 6, 31-68.
- RUBIN B.Y., S.L. ANDERSON, S.A. SULLIVAN, B.D. WILLIAMSON, E.A. CARSWELL, L.J. OLD, 1985:
Purification and characterization of human tumor necrosis factor from the LuKII cell line.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6637-6641.
- RUDDLE N.H., C.B. LI, W.L. TANG, S. FASHENA, 1987: (Kongreßreferat)
Lymphotoxin: function and regulation.
Immunobiol. 175, 30.

- RUFF M.R., G.E. GIFFORD, 1980:
Purification and physico-chemical characterization of rabbit tumor necrosis factor.
J. Immunol. 125, 1671-1677.
- SATO N., T. GOTO, 1987: (Kongreßreferat)
Effect of tumor necrosis factor on angiogenesis.
Immunobiol. 175, 15.
- SATOMI N., K. HARANAKA, O. KUNII, 1981:
Research on the production site of tumor necrosis factor (TNF).
Japan. J. Exp. Med. 51, 317-322.
- SCOTT M.T., 1974:
Corynebacterium parvum as a therapeutic antitumor agent in mice. II. Local injection.
J. Natl. Cancer Inst. 53, 861-865.
- SCUDERI P., K.S. LAM, K.J. RYAN, E. PETERSEN, K.E. STERLING, P.R. FINLEY, C.G. RAY, 1986:
Raised serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infections.
Lancet Dec. 13.1986, 1364-1365.
- SHALABY M.R., B.B. AGGARWAL, E. RINDERKNECHT, L.P. SVEDERSKY, B.S. FINKLE, M.A. PALLADINO JR, 1985:
Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon- γ and tumor necrosis factor.
J. Immunol. 135, 2069-2073.
- SORENSEN W.G., G.F. GERBERICK, D.M. LEWIS, V. CASTRANOVA, 1986:
Toxicity of mycotoxins for the rat pulmonary macrophage *in vitro*.
Environ. Health Perspect. 66, 45-53.
- STASHENKO P., F.E. DEWHIRST, W.J. PEROS, R.L. KENT, J.M. AGO, 1987:
Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor and lymphotoxin in bone resorption.
J. Immunol. 138, 1464-1468.
- STEFFEN M., M. ABBOUD, G.K. POTTER, Y.P. YUNG, M.A. MOORE, 1987:
(Kongreßreferat)
Human mast cells produce tumor necrosis factor- α .
Immunobiol. 175, 36.

- STEINMETZ T., M. SCHAADT, V. SCHENK, R. TÜSCHEN, M. PFREUNDSCHUH,
V. DIEHL, 1987: (Kongreßreferat)
Phase-I-study of intratumoral (i.t.) and intravenous (i.v.)
application of recombinant human tumor necrosis factor (rHuTNF)
in patients with malignant diseases.
Immunobiol. 175, 8.
- STICKL H., T. SCHLEICH, 1985:
Einsatz des Paramunitätsinducers PIND-AVI bei reduzierter
zellvermittelter Abwehrfähigkeit.
Fortschr. Med. 103, 907-909.
- STJERNSWÄRD J., 1966:
Effect of Bacillus Calmette-Guérin and /or Methylcholanthrene on
the antibody forming cells measured at the cellular level by a
hemolytic plaque test.
Cancer Res. 26, 1591-1594.
- STRAUB P., H. KIRCHNER, 1986:
Interferone - Biologische Grundlagen und klinische Anwendung.
Der informierte Arzt - Gazette medicale 20, 48-55.
- SUGARMAN B.J., B.B. AGGARWAL, P.E. HASS, I.S. FIGARI, M.A. PALLADINO
JR, H.M. SHEPARD, 1985:
Recombinant human tumor necrosis factor- α : Effects on
proliferation of normal and transformed cells *in vitro*.
Science 230, 943-945.
- SUYAMA K., J. GOLDSTEIN, S. GREEN, 1985:
Effects of murine tumor necrosis factor on Friend erythroleukemic
cells.
Exp. Cell. Biol. 53, 85-92.
- TITTO De E.H., J.R. CATTERALL, J.S. REMINGTON, 1986:
Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma*
gondii and *Trypanosoma cruzi*.
J. Immunol. 137, 1342-1345.
- TAKEDA K., S. IWAMOTO, H. SUGIMOTO, T. TAKUMA, N. KAWATANI, M.
NODA, A. MASAKI, H. MORISE, H. ARIMURA, K. KONNO, 1986:
Identity of differentiation inducing factor and tumor necrosis
factor.
Nature 323, 338-340.

- TAVERNE J., N. MATTHEWS, P. DEPLEDGE, J.H.L. PLAYFAIR, 1984:
Malarial parasites and tumor cells are killed by the same
component of tumor necrosis serum.
Clin. Exp. Immunol. 57, 293-300.
- TOKUNAGA T., S. YAMAMOTO, R.M. NAKAMURA, T. KATAOKA, 1974:
Immunotherapeutic and immunoprophylactic effect of BCG on 3-
methylcholanthrene-induced autochthonous tumours in Swiss mice.
J. Natl. Cancer Inst. 53, 459-463.
- TORTI F.M., B. DIECKMAN, G. RINGOLD, 1986:
Tumor necrosis factor modulates the expression of adipose
inducible genes.
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 27, 77 Meet., 12.
- TRINCHIERI G., M. ROSEN, B. PERUSSIA, 1987:
Induction of differentiation of human myeloid cell lines by tumor
necrosis factor in cooperation with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3.
Cancer Res. 47, 2236-2242.
- TSUJIMOTO M., Y.K. YIP, J. VILCEK, 1985:
Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in
sensitive and resistant cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7626-7630.
- UCKER D.S., 1987:
Cytotoxic T lymphocytes and glucocorticoids activate an
endogenous suicide process in target cells.
Nature 327, 62-64.
- VILCEK J., V.J. PALOMBELLA, D. HENRIKSEN, C. SWENSON, R. FEINMAN,
M. HIRAI, M. TSUJIMOTO, 1986:
Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and
its relationship to other polypeptid growth factors.
J. Exp. Med. 163, 632-643.
- WAAGE A., T. ESPEVIK, O. BAKKE, A. HALSTENSEN, P. BRANDTZAEG, J.
NISSEN-MEYER, J. LAMVIK, 1987: (Kongreßreferat)
Detection of TNF in human septicemia.
Immunobiol. 175, 41.

WAGNER H., 1988:

Die Rolle von Lymphokinen bei der T-Zell-Aktivierung.
Ringvorlesung der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München, CLASSEN M., München, 10.2.88

WARE C.F., L.M. GREEN, F. COFFMAN, W.H. FLETCHER, 1987:
(Kongreßreferat)

Molecular mechanisms determining target cell sensitivity or
resistance to the cytotoxic activity of the cytotoxic lymphokines.
Immunobiol. 175, 42-43.

WILLIAMSON B.R., E.A. CARSWELL, B.Y. RUBIN, J.S. PRENDERGAST, L.J.
OLD, 1983:

Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines:
Synergistic cytotoxic interaction with human interferon.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5397-5401.

WOLF G., 1987:

Kolonienstimulierende Aktivität in Mäuseseren nach
Vorbehandlung mit Inducern aus Pockenviren und anderen
Mikroorganismen.
Vet. Med. Diss., München

WRIGHT S.C., B. BONAVIDA, 1982:

Studies on the mechanism of natural killer (NK) cell-mediated
cytotoxicity. I. Release of cytotoxic factors specific for NK-
sensitive target cells (NKCF) during co-culture of NK effector
cells with NK target cells.
J. Immunol. 129, 433-439.

ZAWATZKY R., H. KIRCHNER, 1986:

Interferone - Biologische Wirkungen im Hinblick auf den Einsatz
in der Tumorthherapie.
Münch. Med. Wschr. 128, 253-255.

ZBAR B., I.D. BERNSTEIN, G.L. BARTLETT, M.D. HANNA JR, H.J. RAPP,
1972:

Immunotherapy of cancer: regression of intradermal tumors and
prevention of growth of lymph node metastases after intralesional
injection of living Mycobacterium bovis.
J. Natl. Cancer Inst. 49, 119-130.

ZIEGLER-HEITBROCK H., A. MÖLLER, R.P. LINKE, J.G. HAAS, E.P. RIEBER,
G. RIETHMÜLLER, 1986:

Tumor necrosis factor as effector molecule in monocyte mediated
cytotoxicity.

Cancer Res. 46, 5947-5952.

ZIEGLER-HEITBROCK H.W., G. RIETHMÜLLER, 1987: (Kongreßreferat)

Regulation of tumor necrosis factor in healthy subjects and in
immunodeficiency.

Immunobiol. 175, 44.

ZIGHELBOIM J., D. BERD, 1985:

Immunobiology of *Corynebacterium parvum*.

In: The modulation of immunity -1st ed.;ed. by M. S.

Mitchell, Pergamon Press, Oxford

7. Abkürzungen

B+	Benzidin positiv (durch Benzidin anfärbbar)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BFU-E	Burst Forming Unit for Erythropoesis
CD4 ⁺	T-Lymphozyten mit Rezeptor CD4 (T4 Zellen)
CD8 ⁺	T-Lymphozyten mit Rezeptor CD8 (T8 Zellen)
CF	Cytotoxic Factor
CFU-E	Colony Forming Unit for Erythropoesis
CFU-S	Colony Forming Unit in the Spleen
Cp	Corynebacterium parvum (Propionibacterium acnes)
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
E-MEM	Earle's Minimum Essential Medium
E/ml	Einheiten /ml
ED	Dosis efectiva
F4-1	Friend Erythroleukämie Zellklon F4-1
FKS	Fetales Kälber Serum
GM-CSF	Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor
i.l.	intraläsional
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN- α , - β , - γ	Interferon- α , - β , - γ
IL	Interleukin
kD	Kilo Dalton
KID	Kulturinfektiose Dosis
LAK	Lymphokin Activated Killer Cells
LD	Dosis letalis
LLV	Lymphatic Leukemia Virus
LPS	Lipopolysaccharid (von E. coli)
LRG	Leukoregulin
LT	Lymphotoxin

MHC I und II	Major Histocompatibility Complex Class I and II
min.	Minute
MPS	Mononuclear Phagocytosis System
NC	Natural Cytotoxic Cells
NCTC	Natural Cytotoxic T-Cells
ND	New Castle Disease Virus
NK	Natural Killer Zellen
NKCF	Natural Killer Cytotoxic Factor
O*	reaktive Sauerstoffverbindungen, Peroxide, Radikale
OA	Ochratoxin A
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEM	adhäsive Peritoneal-Exsudat mononukleäre Zellen
Poly I:C	Polyinosinylat-polycytidylat
pro inj.	pro injectionem
s.c.	subkutan
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
Std.	Stunde
TNA	Tumor Nekrotisierende Aktivität
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VSV	Stomatitis Vesicularis Virus
WI	Wirkungsindex

Lebenslauf

- 1960 geboren am 5. April in München als 2. Kind von Johanna Marsig, geb. Wittmann und Ernst Marsig, Kaufleute
- 1966 Grundschule Gebelestraße, München
- 1970 Luitpold-Gymnasium München, neusprachlicher Zweig
- 1979 Abitur
- 1979 Militärdienst
- 1980 Studium der Tiermedizin in München
- 1985 Staatsexamen
- 1986 Approbation als Tierarzt
- Beginn der Dissertationsarbeit

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Stickl danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die zahlreichen Anregungen bei meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr für seine vielfache, freundliche Unterstützung.

Den Kollegen Dr. G. Wolf und Dr. M. Büttner sei Dank für die freundschaftlichen, jederzeit gegebenen Ratschläge.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. D. Gericke für seine kollegiale Beratung.

Den Mitarbeiterinnen unserer Abteilung sei besonderer Dank für die hervorragende Zusammenarbeit.

